

Universidad Autónoma de Madrid

Facultad de Ciencias

Departamento de Química Física Aplicada



Caracterización genética y bioquímica de esterasas de compuestos fenólicos de *Lactobacillus plantarum*

Memoria presentada por

María del Mar Esteban Torres

Para optar al grado de

Doctor

Directoras:

Rosario Muñoz Moreno

Blanca de las Rivas González del Rey

INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS Y
NUTRICIÓN

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Madrid, 2014

La Dra. Rosario Muñoz Moreno, Profesora de Investigación del CSIC y la Dra. Blanca de las Rivas González del rey, Científica titular del mismo

CERTIFICAN:

Que la licenciada **María del Mar Esteban Torres** ha realizado bajo su dirección, en el Departamento de Procesos del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición, el trabajo de investigación titulado “Caracterización genética y bioquímica de esterasas de compuestos fenólicos de *Lactobacillus plantarum*” que presenta en el Departamento de Química-Física Aplicada de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid para optar al grado de Doctor.

Y, para que así conste a los efectos oportunos, firman el presente certificado en Madrid a 10 de Junio de 2014.

Directoras de la tesis

Dra. Rosario Muñoz

Dra. Blanca de las Rivas

Abstract

Phenolic esters are important constituents of food products of plant origin and are directly related to sensory characteristics of foods. These compounds, particularly hydroxycinnamoyl esters, are abundant, naturally occurring molecules that contribute to the rigidity of plant cell walls.

Lactobacillus plantarum is frequently found in the fermentation of plant-derived food products, where hydroxycinnamoyl esters are common. Metabolic pathways of biosynthesis or degradation of phenolic compounds in *L. plantarum* have been described. Among the enzymes involved in the metabolism of phenolic compounds are esterases such as arylesterases and feruloyl esterases. Arylesterases are active toward aromatic esters while feruloyl esterases preferably act against hydroxycinnamoyl esters. Precisely, feruloyl esterases are involved in the release of phenolic compounds from plant cell walls, such as ferulic, *p*-coumaric, caffeic and sinapic acids. Although several esterases have been characterized in *L. plantarum*, enzymes having arylesterases and feruloyl esterases have not been described so far. Whereas cultures from *L. plantarum* WCFS1 were unable to hydrolyze hydroxycinnamoyl esters, cell extracts from this strain partially hydrolyze methyl ferulate and methyl *p*-coumarate. Moreover, cultures of some *L. plantarum* strains present feruloyl esterase activity. In this study, in order to determine the esterases from *L. plantarum* responsible for these activities, the putative Lp_0796, Lp_0973, Lp_1002, Lp_1760, Lp_2631, Lp_2923, Lp_3505, Lp_3561, Lp_3562 and Est_1092 esterases have been recombinantly overproduced and biochemically characterized. These enzymes exhibited arylesterase activity as they hydrolyzed phenyl acetate efficiently. Remarkably, Lp_0796 and Est_1092 also hydrolyse the four model substrates archetypical for feruloyl esterases. Upon methyl ferulate exposure, the expression of *est_1092* was induced, whereas *lp_0796* expression was not affected. Est_1092 was present in 7 out of 29 *L. plantarum* strains, whose cultures exhibited feruloyl esterase activity. The presence of Est_1092 in *L. plantarum* WCFS1 cultures (which is unable to hydrolyze hydroxycinnamoyl esters) conferred feruloyl esterase activity to this strain. In this study, we describe for the first time the metabolism of hydroxycinnamoyl esters by *L. plantarum*, reporting the analyses of novel arylesterases and feruloyl esterases

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1. Ésteres en alimentos	3
1.1. Esteres fenólicos	4
1.2. Clasificación	3
2. Esterasas (hidrolasas de ésteres carboxílicos)	8
2.1. estructura general de esterazas	11
2.2. Mecanismo catalítico de esterazas	12
2.3. Clasificación de esterazas	13
2.4. Clasificación de esterazas	14
2.5. Aplicaciones de esterazas en la industria alimentaria	16
3. Bacterias lácticas en alimentos de origen vegetal	17
3.1. Metabolismo de ésteres fenólicos en bacterias lácticas	19
3.1.1. Metabolismo de compuestos fenólicos en <i>L. plantarum</i>	20
II. OBJETIVOS	26
III. MATERIALES Y MÉTODOS	29
1. Estirpes bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos	31
2. Medios y condiciones de cultivo	35
3. Técnicas de DNA	36
3.1 Extracción de DNA cromosómico	36
3.2 Extracción de DNA plasmídico	37
3.3 Amplificación de secuencias de DNA mediante PCR	37
3.4 Electroforesis de DNA en geles de agarosa	39
3.5 Purificación de DNA a partir de agarosa	39
3.6 Método de clonación independiente de ligación (LIC)	39
3.7 Secuenciación de DNA y análisis de la información	41
3.8 Manipulación de DNA con enzimas de uso común en biología molecular	41
3.9 Interrupción genética en <i>L. plantarum</i>	41
4. Transformación genética en <i>E. coli</i>	43
5. Transformación genética en <i>L. plantarum</i>	43

6. Transformación genética en <i>L. lactis</i>	44
7. Técnicas de proteínas	45
7.1. Preparación de extractos proteicos	45
7.2. Hiperproducción y purificación de enzimas recombinantes	46
7.3. electroforesis en geles de poliacrilamida	48
7.4. Identificación de proteínas mediante huella peptídica y fragmentación MALDI-TOF/TOF	48
7.5. Caracterización bioquímica de las enzimas esterasas	49
7.6. Cristalización y estudio estructural	51
7.6.1 Resolución estructural	52
7.6.2. Ultracentrifugación analítica	53
8. Ensayos de actividad enzimática	53
8.1. Métodos colorimétricos para la detección de la actividad esterasa	53
8.1.1. sustratos derivados de <i>p</i> -nitrofenilo	53
8.1.2. Librería de ésteres	54
8.2. Método colorimétrico para la detección de la actividad tanasa	56
8.3. Análisis mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	57
9. Técnicas de RNA	58
9.1. Extracción de RNA	58
9.1.1. Exposición de los cultivos de <i>L. plantarum</i> a los compuestos a analizar	58
9.1.2. Extracción y purificación del RNA	58
9.2. Validación de las muestras de RNA	59
9.3. Tratamiento del RNA con DNasa	59
9.4. Análisis de la expresión génica mediante PCR cuantitativa en tiempo real	60
9.4.1. Síntesis del cDNA mediante la enzima transcriptasa inversa	60
9.4.2. Diseño de los oligonucleótidos para el análisis mediante RT-qPCR	60
9.4.3. Ensayo de RT-qPCR	61

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	64
1. Metabolismo de ésteres fenólicos en <i>L. plantarum</i> WCFS1	65
1.1. Metabolismo de ésteres fenólicos en <i>L. plantarum</i> WCFS1	66
1.1.1. Degradación de ésteres fenólicos en cultivos	66
1.1.2. Degradación de ésteres fenólicos en extractos libres de células	68
1.2. Identificación <i>in silico</i> de esterasas en el genoma de <i>L. plantarum</i> WCFS1	70
1.3. Producción e identificación de sustratos de esterasas de <i>L. plantarum</i> WCFS1	73
1.3.1. Lp_0796	74
1.3.2. Lp_0973	79
1.3.3. Lp_1002	83
1.3.4. Lp_1760	87
1.3.5. Lp_2631	91
1.3.6. Lp_2923	94
1.3.7. Lp_3505	97
1.3.8. Lp_3561	100
1.3.9. Lp_3562	103
1.4. Esterasas de ésteres fenólicos en <i>L. plantarum</i> WCFS1	105
1.4.1. Identificación y caracterización bioquímica de arilesterasas	107
1.4.1.1. Lp_0973	109
1.4.1.2. Lp_1002	111
1.4.1.3. Lp_2631	114
1.4.1.4. Lp_2923	117
1.4.1.5. Lp_3505	118
1.4.1.6. Lp_3561	120
1.4.2. Identificación y caracterización bioquímica de feruloil esterasas	122
1.4.2.1. Lp_0796	125
1.4.3. Cristalización y resolución de la estructura tridimensional	127
1.4.3.1. Lp_0973	128

1.4.3.2. Lp_2923	134
2. Metabolismo de ésteres fenólicos en otras cepas de <i>L. plantarum</i>	138
2.1. Presencia de genes de arilesterasas/feruloil esterasas en otras cepas de <i>L. plantarum</i>	138
2.1.1. Presencia de los genes en cepas de <i>L. plantarum</i> secuenciadas	139
2.1.2. Presencia de genes en una colección de cepas de <i>L. plantarum</i>	143
2.2. Metabolismo de ésteres fenólicos en cultivos de cepas de <i>L. plantarum</i>	149
2.3. Identificación y caracterización de la feruloil esterasa JDM1_1092	154
2.3.1. Producción y caracterización de JDM1_1092	156
2.3.2. Expresión heteróloga de JDM1_1092 en <i>L. lactis</i> y <i>L. plantarum</i>	168
3. Estudio de la expresión de genes de esterasas mediante RT-qPCR	173
V. CONCLUSIONES	179
VI. BIBLIOGRAFÍA	183

INTRODUCCIÓN

1. Ésteres en alimentos

Los ésteres son compuestos presentes en la mayoría de alimentos y que influyen en el aroma de los mismos. Los ésteres se encuentran en niveles traza en los alimentos, de manera que de forma individual están por debajo o cercano al nivel umbral. A pesar de encontrarse en bajas concentraciones, estos compuestos son muy importantes en el perfil aromático. En alimentos, existen dos grupos principales de ésteres, los ésteres de acetato y los ésteres de etilo de ácidos grasos de cadena media. En los primeros, los ésteres de acetato, el grupo ácido es el acetato y el alcohol puede ser etanol o un alcohol complejo producido durante el metabolismo de los aminoácidos, dentro de estos ésteres se encuentran el acetato de etilo (aroma a disolvente), acetato de isoamilo (aroma a plátano), acetato de isobutilo (aroma afrutado), acetato de feniletilo (aroma a rosas, miel). En el segundo grupo de ésteres, ésteres de etilo de ácidos grasos de cadena media, el alcohol es etanol y el grupo ácido es un ácido graso de cadena media, encontrándose en este grupo el hexanoato de etilo (aroma afrutado, a violetas), octanoato de etilo (aroma a piña, pera), caprilato de etilo (olor a manzana ácida) y decanoato de etilo (aroma floral) (Matthews, et al., 2004). Otro grupo de ésteres importante en alimentos de origen vegetal son los ésteres fenólicos, como los ésteres de ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos. De estos grupos, los ésteres de acetato son los más estudiados debido a que se encuentran en niveles más altos y por lo tanto son más fáciles de cuantificar. El acetato de etilo es el éster más abundante en alimentos como el vino y, debido a su bajo nivel umbral, a menudo es el que más contribuye a su aroma. La acumulación de ésteres en alimentos, es el resultado del balance entre las reacciones de síntesis y de hidrólisis de las enzimas esterasas presentes.

1.1. Ésteres fenólicos

El término compuestos fenólicos describe a un conjunto heterogéneo de moléculas que presentan en su estructura uno o varios anillos bencénicos sustituidos por al menos un grupo hidroxilo o metoxi (Sanchez-Maldonado, et al., 2011). Se encuentran de forma natural en las plantas y constituyen el principal grupo de metabolitos secundarios presentes en todo el reino vegetal. La mayoría de los compuestos fenólicos se sintetizan en plantas superiores a partir del del ácido siquímico intermediario en la producción de los aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano), a través de la ruta metabólica general de los fenilpropanoides (Robbins, 2003). Fisiológicamente estos compuestos son esenciales para el crecimiento y reproducción de las plantas, actuando a su vez como antipatógenos y disuasores del ramoneo. Además, funcionan como antibióticos, pesticidas naturales, atrayentes para la polinización, agentes protectores frente a la radiación UV, materiales estructurales que aportan estabilidad a las plantas y aislantes que impermeabilizan las paredes celulares.

Por tanto, la mayoría de éstas moléculas son bioactivas, interactúan con el medio ambiente y desempeñan un importante papel de protección contra el estrés abiótico y biótico en las plantas (Tohge, et al., 2013).

Los compuestos fenólicos, así como sus ésteres se localizan principalmente en frutos y órganos aéreos jóvenes, por lo que se consumen diariamente en la dieta en cantidades significativas (Harborne y Williams, 2000). Muchos de ellos influyen en gran medida en las propiedades organolépticas de los alimentos, las cuales poseen una gran importancia en la calidad final de los mismos. En la dieta humana las fuentes principales de compuestos fenólicos son las frutas, vegetales, aceite y bebidas tales como el té y café.

1.2. Clasificación

Las estructuras químicas de los compuestos fenólicos son muy diversas,

incluyendo desde ácidos fenólicos simples de bajo peso molecular hasta moléculas poliméricas de elevada masa molecular como los taninos condensados y los hidrolizables.

Los compuestos fenólicos se han clasificado tradicionalmente en ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos y taninos en función del número de anillos aromáticos y de los elementos estructurales que unen unos anillos a otros (Manach, et al., 2004).

Los ácidos fenólicos son una subclase de compuestos fenólicos muy abundantes (agrupan aproximadamente a 8.000 compuestos) sintetizados por plantas y que contribuyen a la rigidez de las paredes celulares vegetales. Los ácidos fenólicos comparten una estructura común formada por un anillo aromático con, al menos, un grupo hidroxilo y un ácido carboxílico como grupo funcional (Robbins, 2003). Estos ácidos fenólicos aparecen formando parte de la estructura de las paredes celulares de las plantas y de algunas vacuolas (Lynd, et al., 2002). Los ácidos fenólicos se asocian a cualidades sensoriales y nutricionales de los alimentos (Vanbeneden, et al., 2008).

Estos compuestos constituyen un tercio de los compuestos fenólicos de la dieta, por lo que existe un gran interés en el estudio de sus propiedades, fundamentalmente en cuanto a su potencial antioxidante (Fauds, 2010). Dentro de los ácidos fenólicos se pueden diferenciar dos grupos principales, los ácidos benzoicos y los ácidos cinámicos (Figura 1). Estos compuestos se encuentran predominantemente como ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos tanto en su forma libre o conjugados (Garrido y Borges, 2013).

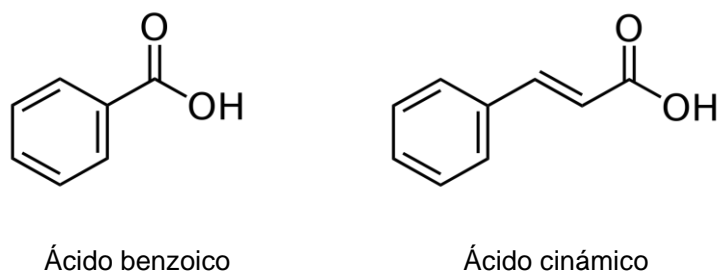


Figura 1. Estructura química de los ácidos benzoico y cinámico.

Los ácidos benzoicos presentan una estructura formada por siete átomos de carbono (C6-C1) sobre la que se producen reacciones de hidroxilación y metilación para dar lugar a los distintos ácidos benzoicos (Garrido y Borges, 2013). Generalmente aparecen en bajas concentraciones en frutas y verduras, excepto en frutas rojas (Tomás-Barberán y Espín, 2001). Los más frecuentes son los ácidos gálico, elágico, *p*-hidroxibenzoico, vanilínico, sirínico y protocatéquico. Los ácidos gálico y elágico son constituyentes de los taninos hidrolizables y aparecen en frutas como la frambuesa, zarzamora o granada por hidrólisis de los anteriores. Los ácidos *p*-hidroxibenzoico y vanilínico se encuentran en numerosas frutas como la cereza, uva, melón y fresa (Macheix y Fleuriet, 1998). En la uva, los ácidos benzoicos más representativos son los ácidos gálico, *p*-hidroxibenzoico, vanilínico y sirínico (Garrido y Borges, 2013).

Los ácidos cinámicos son los ácidos fenólicos más comunes y tienen en común una estructura formada por 9 átomos de carbono (C6-C3) (Garrido y Borges, 2013). Los más frecuentes son los ácidos *p*-cumárico, cafeico, ferúlico y sinápico (Figura 2). Es difícil encontrar estos ácidos en su forma libre, exceptuando en los alimentos que han sufrido congelación, esterilización o fermentación durante su procesado (Manach, et al., 2004). El ácido cafeico, tanto en su forma libre como en su forma esterificada, es el ácido fenólico más frecuente en la mayoría de las frutas, representando entre el 75 y el 100% del contenido total de ácidos fenólicos en este grupo de alimentos (Manach, et al., 2004). Sin embargo, el ácido ferúlico es el ácido fenólico mayoritario en cereales (Lafay y Gil-Izquierdo, 2008).

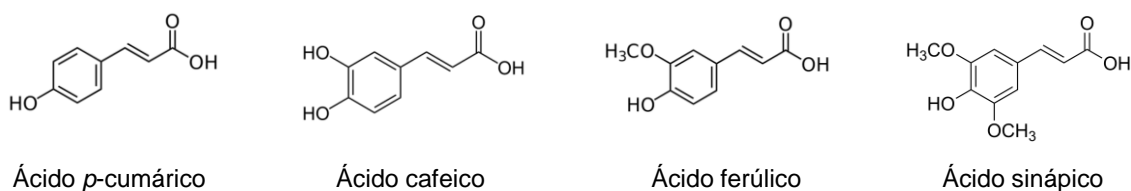


Figura 2. Estructura química de cuatro ácidos hidroxicinámicos.

Además, los hidroxycinamatos se encuentran en elevadas cantidades en productos derivados de la industria agroalimentaria. En los últimos años ha crecido el interés industrial de los ácidos hidroxicinámicos ya que son moléculas bioactivas que presentan actividad antioxidante y beneficios para la salud. Se ha descrito la actividad antimicrobiana de los ácidos fenólicos y su posible aplicación como conservantes de alimentos (Sanchez-Maldonado, et al., 2011). La actividad antimicrobiana de estos compuestos viene determinada por su estructura química, en particular por el número y la posición de los sustituyentes del anillo bencénico y la longitud de la cadena saturada. De manera general, los ácidos fenólicos presentan menor actividad antimicrobiana comparada con sus ésteres (Sanchez-Maldonado, et al., 2011).

Los flavonoides son compuestos fenólicos de gran variabilidad estructural, muy abundantes en alimentos de origen vegetal e implicados en las propiedades organolépticas de frutas y verduras (Harborne y Williams, 2000). Los flavonoides incluyen a antocianos, flavonoles, flavan-3-oles (catequinas) flavonas, flavononas, isoflavonoides y protoantocianidinas (componentes de taninos condensados).

Los estilbenos están ampliamente distribuidos en el reino vegetal, sin embargo son poco habituales en los alimentos y por tanto se presentan en muy bajas cantidades en la dieta humana. Básicamente su presencia se restringe a las uvas, el vino tinto, los cacahuetes y distintas bayas como los arándanos y los mirtilos. Entre los estilbenos más importantes se encuentra el resveratrol y el piceatanol.

Por último, los taninos son compuestos polifenólicos que presentan un elevado peso molecular entre 500 y 3.000 Da, aunque pueden llegar a los 30.000 Da, que se caracterizan por su capacidad para precipitar proteínas. Se localizan en todas las partes de la planta: raíces, corteza, ramas, semillas y hojas. Se ha descrito su presencia en multitud de alimentos como fresas, moras, plátanos, nueces y granadas, entre otros y en bebidas como el vino y té (Serrano, et al., 2009). Los taninos se dividen en taninos condensados e hidrolizables según su comportamiento frente a agentes hidrolíticos. Los taninos condensados están formados por la polimerización de flavonoides y son frecuentes en la corteza y la madera de plantas. Tras un tratamiento con reactivos hidrolíticos, los taninos condensados no liberan sus unidades

estructurales sino que, por el contrario, tienden a polimerizarse aún más. Sin embargo, los taninos hidrolizables se pueden hidrolizar mediante diversos tratamientos (enzimáticos, térmicos, condiciones ácidas o básicas, etc.) liberando los ácidos fenólicos y azúcares que los constituyen. A su vez, dentro de los taninos hidrolizables se puede diferenciar entre galotaninos, cuya hidrólisis libera ácido gálico, y elagitaninos que liberan ácido elágico.

La contribución de los compuestos fenólicos al aroma de los alimentos se debe, entre otros, a la presencia de fenoles volátiles producidos por la hidrólisis de alcoholes superiores o por el metabolismo de microorganismos como levaduras y bacterias lácticas (Tomás-Barberán y Espín, 2001). Algunos compuestos derivados de los ácidos cinámicos, como los ácidos *p*-cumárico y ferúlico, también son importantes en el aroma. La descarboxilación de estos ácidos origina la formación de 4-vinil fenol y 4-vinil guayacol que son compuestos aromáticos útiles e intermediarios muy valiosos en la producción biotecnológica de nuevos aromas. Sin embargo, la reducción de estos vinil fenoles origina etil fenol y etil guayacol, que se consideran olores desagradables (*offflavors*) y son responsables de alteraciones en las propiedades organolépticas de algunos alimentos (Rodríguez, et al., 2009).

De manera general, la acumulación de ésteres en alimentos, es el resultado del balance entre las reacciones de síntesis y de hidrólisis de las enzimas esterasas presentes.

2. Hidrolasas de ésteres carboxílicos (esterasas)

Las hidrolasas de ésteres carboxílicos (EC 3.1.1.x), generalmente conocidas como esterasas son las enzimas que catalizan tanto la síntesis como la hidrólisis de enlaces éster (formados entre un ácido y un alcohol) en función de las condiciones de reacción. Estas enzimas se encuentran ampliamente distribuidas en animales, plantas y microorganismos (Bornscheuer, 2002). La formación de ésteres se puede llevar a cabo mediante la esterificación directa de alcoholes con ácidos (esterificación), o a través de las reacciones de ésteres

con alcoholes (alcoholisis), con ácidos (ácidolisis) o con otros ésteres (interesterificación o transesterificación). Estas enzimas generalmente presentan una amplia especificidad por sustratos muy diferentes, por lo que se asume que están implicadas tanto en el acceso a fuentes de carbono, como en rutas catabólicas.

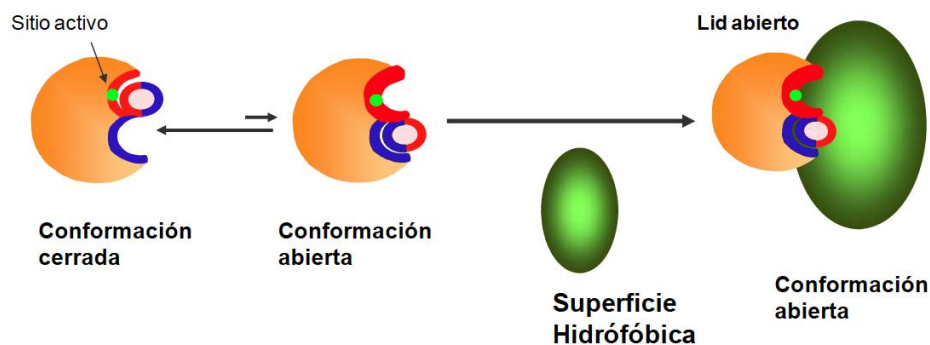
Además, estas enzimas presentan frecuentemente regio- y estereoespecificidad, lo que les hace unas herramientas ideales para la producción de compuestos quirales puros (Sharma, et al., 2001). El interés de estas enzimas también reside en el hecho de que no necesitan cofactores e incluso son activas en un amplio rango de temperaturas, pH y solventes orgánicos, aunque la mayoría presentar mayor actividad a pH neutros o básicos (Bornscheuer, 2002). Por todo ello, estas enzimas presentan mucho interés en biotecnología.

Las esterasas se encuentran ampliamente distribuidas en animales, plantas y microorganismos y constituyen una familia de enzimas con un amplio rango de sustratos. Por ello, la clasificación de estas enzimas en función de la especificidad de sustratos es complicada. Teniendo en cuenta las recomendaciones del Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (NC-IUBMB), las esterasas se dividen en distintas subclases (aproximadamente 90). Entre estas enzimas se pueden distinguir carboxilesterasas (EC 3.1.1.1), arilesterasas (EC 3.1.1.2), lipasas (EC 3.1.1.3) acetilesterasas (EC 3.1.1.6), tanasas (EC 3.1.1.20) y feruloil esterasas (EC 3.1.1.73).

Las carboxilesterasas y las arilesterasas catalizan típicamente la hidrólisis de ésteres alifáticos solubles en agua de cadena corta o media, y las últimas se distinguen por su preferencia por la hidrólisis de ésteres aromáticos. Por el contrario, las lipasas generalmente presentan actividad frente a ésteres de cadena larga e insolubles en agua (Bornscheuer, 2002). Las lipasas también se pueden distinguir de las carboxilesterasas porque presentan cinéticas de Michaelis-Menten atípicas, caracterizadas por curvas sigmoideas, debido a que estas enzimas presentan el fenómeno de activación interfacial (Arpigny y Jaeger, 1999). Según este mecanismo catalítico, las lipasas se activan en presencia de una interfase hidrofóbica. A bajas concentraciones de sustrato, la actividad enzimática es también baja, sin embargo, cuando la concentración de

sustrato aumenta y alcanza la concentración micelar crítica, la actividad catalítica aumenta bruscamente (Arpigny y Jaeger, 1999). La concentración micelar crítica es la interfase formada entre las micelas del sustrato hidrofóbico y la fase acuosa hidrofílica conteniendo a la lipasa disuelta. Estas características se deben a la presencia en muchas lipasas de un dominio hidrofóbico α -hélice flexible (tapa), que expone el sitio activo y orienta la unión del sustrato a la interfase entre el agua y las fases solventes únicamente en presencia de una concentración mínima de sustrato (Winkler, et al., 1990). De esta forma, cuando la lipasa se une a una interfase hidrofóbica tiene lugar un cambio conformacional que produce el desplazamiento de la tapa dejando el centro activo accesible (conformación abierta) (Figura 3). De esta forma, la parte hidrofóbica de la tapa queda expuesta a la fase lipídica favoreciendo las interacciones hidrofóbicas entre la enzima y la superficie lipídica (Jaeger, et al., 1999).

Figura 3. Fenómeno de activación interfacial. Las lipasas experimentan un cambio conformacional en respuesta a la adsorción a una interfase hidrofóbica. El desplazamiento de la tapa permite la accesibilidad del centro activo para el sustrato.



Comparativamente, las lipasas contienen un mayor número de aminoácidos no-polares (como Leu, Ile o Val) implicados en la unión a los sustratos hidrofóbicos (Kim, et al., 1997). Finalmente, las lipasas también se distinguen de las esterasas por tener su actividad óptima a pH más alcalinos (típicamente a pH 8) (Arpigny y Jaeger, 1999), mientras que las lipasas

generalmente presentan su actividad óptima a pH menores (alrededor de 6) (Bornscheuer, 2002).

2.1. Estructura general de esterasas

El incremento de la resolución de numerosas estructuras cristalizadas de las enzimas esterasas ha permitido el conocimiento de su estructura tridimensional. Estas proteínas presentan un plegamiento muy similar, a pesar de la baja similitud de sus secuencias de aminoácidos (Jaeger, et al., 1999). La estructura tridimensional general de estas enzimas muestra un plegamiento característico α/β -hidrolasa, que consiste en una disposición de hélices α y hebras β típico conteniendo los residuos catalíticos (Figura 4). La lámina β central está constituida generalmente por 8 hebras β paralelas a excepción de la segunda hebra que es antiparalela, rodeada a ambos lados por hélices α . Dicho dominio α/β se ha reconocido como un patrón de plegamiento característico presente en diferentes hidrolasas (Bornscheuer, 2002). El sitio activo está formado por una triada catalítica típica de las serínproteasas, formado por los residuos Ser, Asp e His, aunque en algunas lipasas aparece Glu en lugar de Asp. Normalmente, la serina es el residuo nucleófilo del centro activo y se localiza en un pentapéptido conservado Gly-X-Ser-X-Gly (codo nucleófilo), donde X representa cualquier aminoácido. Por otro lado, se han descrito un grupo de esterasas que no comparten este patrón común, las esterasas de la familia GDSL (Akoh, et al., 2004). Esta familia se caracteriza por la sustitución de la secuencia consenso por el motivo Gly-Asp-Ser-Leu y presentan el residuo catalítico desplazado hacia el extremo N-terminal, en comparación con las proteínas que siguen el patrón convencional (Akoh, et al., 2004).

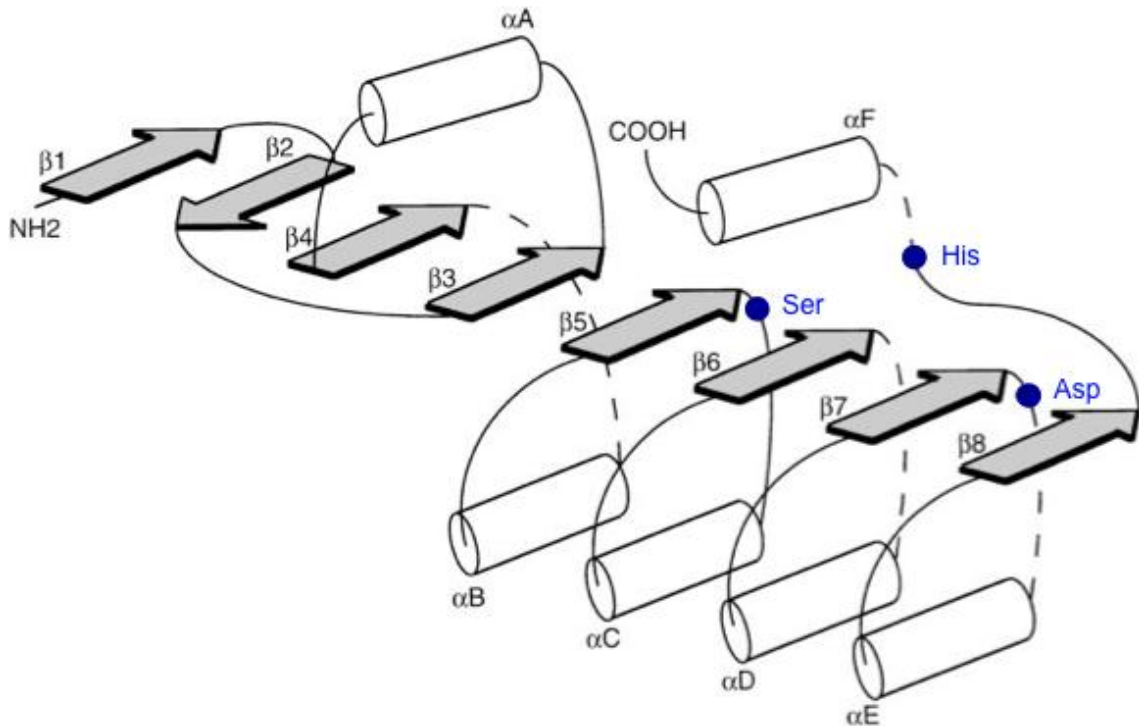


Figura 4. Representación esquemática del patrón de plegamiento característico α/β -hidrolasa. Las hebras β (1-8) se muestran con flechas grises, las hélices α (A-F) como columnas. También se muestra la posición relativa de los residuos de la triada catalítica Ser-Asp-His en círculos azules (Bornscheuer, 2002).

2.2. Mecanismo catalítico de esterasas

El mecanismo para la síntesis o la hidrólisis de enlaces éster de esterasas se compone fundamentalmente de cuatro pasos (Jaeger, et al., 1999). Durante la reacción, se forma un intermedio tetraédrico que posteriormente da lugar a un complejo acilenzima. La lipasa libre se regenera por una reacción de hidrólisis mediada por una molécula de agua (Figura 5). Inicialmente, el sustrato se une al bolsillo de unión del sustrato, donde se localiza la triada catalítica. De esta forma, la serina del centro activo próxima al grupo carbonilo del enlace a romper y tiene lugar un ataque nucleófilo del oxígeno de la cadena lateral de la serina sobre el átomo de carbono carbonílico del enlace éster permitiendo la formación del intermedio tetraédrico (Figura

5.1). Este intermediario se estabiliza mediante la interacción con los residuos catalíticos His y Asp. La histidina ayuda a incrementar la nucleofilia del grupo hidroxilo de la serina (Figura 5.2). El intermedio tetraédrico establece dos enlaces de hidrógeno con los grupos amida de residuos situados en el agujero del oxianión. Posteriormente, se libera el alcohol y se forma un complejo acilenzima (Figura 5.3). Finalmente, el ataque de un nucleófilo (agua en el caso de hidrólisis, alcohol o éster en transesterificación) forman de nuevo un intermedio tetraédrico que tras la reacción libera el producto (un ácido o un éster) y la enzima libre se regenera (Figura 5.4) (Jaeger, et al., 1999).

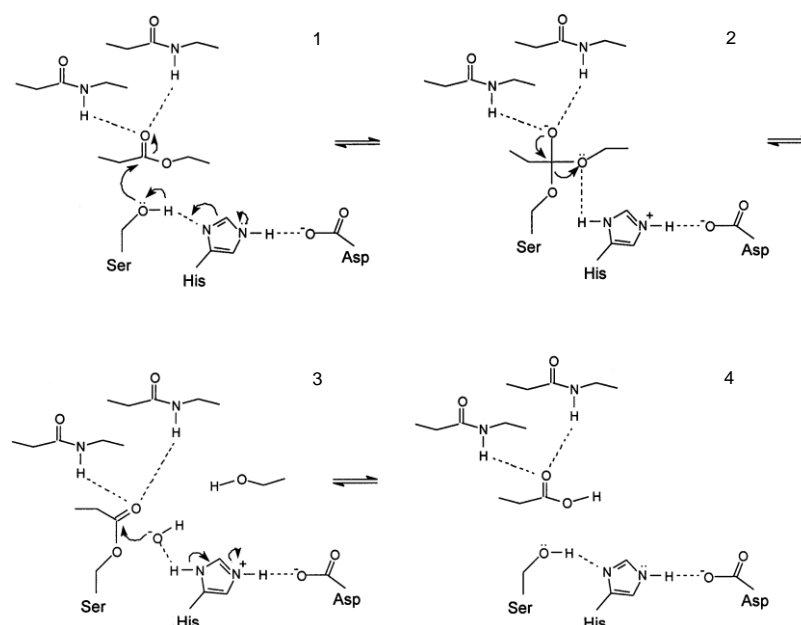


Figura 5. Mecanismo de reacción de esterasas (Jaeger, et al., 1999).

2.3. Clasificación de esterasas

La clasificación de enzimas se puede hacer en base a su especificidad de sustrato, en base a su homología de secuencia (Bornscheuer, 2002) o en función de la especificidad del sustrato y la sensibilidad a varios inhibidores de

estas enzimas. La primera de ellas requiere que todas las enzimas que se van a comparar se ensayen con los mismos sustratos o al menos con sustratos relacionados, preferentemente bajo las mismas condiciones de reacción. Debido al incremento de secuencias disponibles en las bases de datos, la comparación de secuencias de aminoácidos puede proporcionar información sobre la relación evolutiva entre enzimas de diferentes orígenes. Por otro lado, una elevada identidad de secuencia de aminoácidos no está directamente relacionado con las propiedades bioquímicas de las enzimas y se ha descrito que en algunos casos catalizan diferentes tipos de reacciones completamente diferentes (Bornscheuer, 2002). Pese a ello, la clasificación más aceptada fue la propuesta por Arpigny y Jaeger en 1999, que en base a la comparación de las secuencias de esterasas bacterianas, realizaron una clasificación de acuerdo a los motivos conservados de la secuencia y de las propiedades biológicas de estas enzimas (Arpigny y Jaeger, 1999). De acuerdo con este criterio clasificaron a estas enzimas en 8 familias: familia I (verdaderas lipasas), familia II (familia GDSE), familia III, familia IV (lipasas sensibles a hormonas (HSL)), la familia V, la familia VI, la familia VII y la familia VIII (Arpigny y Jaeger, 1999). En las siguientes líneas se van describir las generalidades de las enzimas lipolíticas bacterianas de las diferentes familias propuestas por Arpigny y Jaeger en 1999 (Arpigny y Jaeger, 1999).

2.4. Esterasas de ésteres fenólicos

Como se ha mencionado, entre las subclases de hidrolasas de ésteres carboxílicos en función del sustrato que hidrolizan, se encuentran enzimas que actúan sobre ésteres aromáticos como las arilesterasas (EC 3.1.1.2), tanasas (EC 3.1.1.20) y feruloil esterazas (EC 3.1.1.73). La diferenciación entre estos grupos de enzimas es complicada, por todo ello, no es fácil clasificar estas enzimas en base a su especificidad de sustrato. De forma general, las arilesterasas son una subclase de hidrolasas que actúan sobre muchos ésteres fenólicos, hidrolizando típicamente acetato de fenilo, que sería el sustrato

modelo de arilesterasas, según la base de datos BRENDA (<http://www.brenda-enzymes.info>). La enzima tanasa o tanín acil hidrolasa (EC 3.1.1.20) cataliza concretamente la hidrólisis de los enlaces éster presentes en galotaninos, taninos hidrolizables y en ésteres del ácido gálico. Por otro lado, las feruloil esterases (EC 3.1.1.73), también conocidas como cinamoil esterases e hidrolasas de ácidos cinámicos, son una subclase de hidrolasas de ésteres carboxílicos que generalmente hidrolizan el enlace éster entre los ácidos cinámicos y los azúcares de las paredes celulares vegetales (Figura 6). Estas enzimas que actúan sobre ésteres aromáticos son muy importantes en biotecnología, puesto que tienen numerosas aplicaciones en la industria agroalimentaria y farmacéutica, y se pueden utilizar no sólo para degradar residuos vegetales, sino también para sintetizar nuevos compuestos bioactivos (Vieites, et al., 2010). Debido al interés industrial de estas enzimas y a la dificultad para distinguir las en función sólo de su secuencia (Fojan, et al., 2000), la función de estas proteínas se debe confirmar mediante la caracterización bioquímica de la correspondiente proteína.

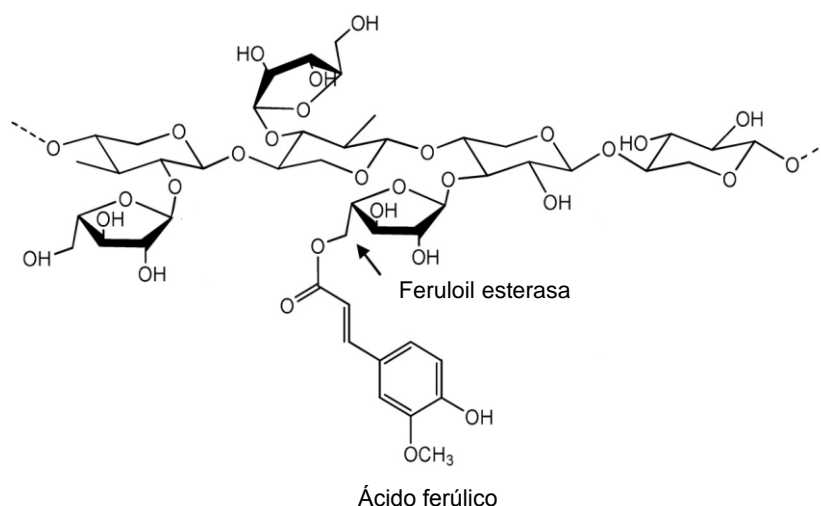


Figura 6. Actividad de una enzima con actividad feruloil esterasa. Se indica la actividad que hidroliza el enlace éster entre el ácido ferúlico y los azúcares presentes en las paredes celulares vegetales.

2.5. Aplicaciones de las esterasas en la industria alimentaria

De manera general, las esterasas de ácidos carboxílicos de origen microbiano, principalmente las bacterianas y las fúngicas representan la clase enzimática más utilizada en aplicaciones biotecnológicas y química orgánica debido a su versatilidad (Gupta y Roy, 2004). El interés de estas enzimas también reside en el hecho de que no requieren cofactores, son generalmente estables y son activas incluso en solventes orgánicos (Bornscheuer, 2002). La elevada versatilidad de estas enzimas, reconocidas como el grupo de biocatalizadores más importante en aplicaciones biotecnológicas, permite su aplicación en diferentes industrias como la alimentaria, farmacéutica, cuero, textil, cosmética y papel (Panda y Gowrishankar, 2005).

Concretamente, en la industria alimentaria, las esterasas se emplean entre otras en la industria láctica y también para la elaboración de vinos, zumos de frutas, cerveza y otras bebidas alcohólicas, ya que transforman grasas, aceites y otros compuestos de bajo valor en otros de mayor valor añadido (Panda y Gowrishankar, 2005).

En los alimentos fermentados, el potencial enzimático de los microorganismos es esencial para la calidad del producto final ya que son responsables de las características sensoriales u organolépticas de los mismos. Los compuestos que influyen en las características organolépticas de los alimentos se originan por las reacciones de síntesis e hidrólisis o de modificaciones que tienen lugar durante el proceso de elaboración. En muchos de estos procesos están implicados las enzimas procedentes de los microorganismos que llevan a cabo el proceso de fermentación (Matthews, et al., 2004).

En el desarrollo de nuevos tratamientos con enzimas se han centrado los esfuerzos en la identificación de actividades deseadas en los microorganismos que llevan a cabo el proceso de elaboración de alimentos.

Una de las enzimas importantes en estos procesos son las esterasas, ya que modulan el perfil de ésteres presente en los alimentos, los cuales presentan un papel determinante la calidad del producto final. En este contexto, existen numerosos ésteres fenólicos en los alimentos, por lo que las esterasas de ésteres fenólicos como arilesterasas, tanasas y feruloil esterasas presentan importantes aplicaciones en la industria alimentaria. Algunos de estos ésteres presentan propiedades indeseables en los alimentos. En algunos alimentos como el té instantáneo existen precipitados insolubles que afectan a la calidad del té. Estos precipitados se producen de manera natural cuando la bebida se enfría a bajas temperaturas y están formados por una polimerización de polifenoles esterificados, por lo que la enzima tanasa hidroliza estos enlaces éster y evita así la precipitación de los mismos (Rodríguez, et al., 2009).

El ácido ferúlico es el principal ácido fenólico que se encuentra esterificado a distintos polisacáridos de la pared celular de las plantas, aunque también se encuentran otros ácidos fenólicos como cafeico y *p*-cumárico. Se ha descrito que estos ácidos presentan una notable capacidad antioxidante. Esta capacidad resulta de gran interés para las industrias de alimentación, cosmética y farmacéutica. Por ello, las enzimas feruloil esterasas, capaces de hidrolizar el enlace éster entre los ácidos hidroxicinámicos y los azúcares de las paredes celulares vegetales son muy importantes en biotecnología. De esta forma, se liberan ácidos como el ferúlico a partir de sustratos lignocelulósicos que presenta una potente aplicación como saborizante de alimentos como un precursor de vanillina (Koseki et al., 2009).

3. Bacterias lácticas en alimentos de origen vegetal

Las bacterias lácticas o bacterias del ácido láctico (BAL) representan un grupo heterogéneo de bacterias que responden a la definición de “bacterias en forma de cocos o bacilos, Gram positivas, catalasa negativas, inmóviles, no esporuladas, anaerobias aerotolerantes, y que producen ácido láctico como metabolito mayoritario de la fermentación de azúcares” (Stiles y Holzapfel, 1997). Las bacterias lácticas incluyen especies de los géneros *Lactobacillus*,

Leuconostoc, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Enterococcus* y *Oenococcus* entre otros (Makarova, et al., 2006).

Los hábitats naturales de estos microorganismos incluyen plantas y animales, donde se asocian con las superficies de las mucosas de estos últimos como por ejemplo del tracto gastrointestinal y la vagina. La amplia distribución que presentan estas bacterias implica una adaptación especializada a diversos ambientes y una gran versatilidad metabólica (Makarova, et al., 2006). La fermentación de sustratos vegetales o de origen animal así como la fermentación espontánea llevada a cabo por BAL se utiliza desde hace siglos para aumentar la vida útil de diversos alimentos. Este proceso de fermentación ha dado lugar a una serie de alimentos tales como el queso, mantequilla, yogur, chucrut, aceitunas, embutidos o pan entre otros (Caplice y Fitzgerald, 1999, Smid y Lacroix, 2013).

Las BAL se consideran como las responsables, totalmente o en parte, de importantes características organolépticas de algunos alimentos así como de su conservación, por lo que constituyen un grupo bacteriano beneficioso y muy importante para el hombre. Por lo tanto, la fermentación de alimentos de origen vegetal es una de las alternativas para el mantenimiento y/o la mejora de las propiedades nutricionales y sensoriales de los alimentos de origen vegetal, así como para el incremento de su vida media (Rodríguez, et al., 2009). La composición de la microbiota y su desarrollo son factores importantes que afectan a la fermentación y a la calidad del producto final y en este sentido los microorganismos dominantes durante una fermentación se determinan por el sustrato utilizado, la temperatura del proceso y otras condiciones ambientales (Hugenholtz, 2008). Las bacterias lácticas forman parte de la microbiota autóctona de los alimentos de origen vegetal y por lo tanto, predominan en las fermentaciones de estos alimentos, debido principalmente a que están adaptadas a la presencia de compuestos fenólicos abundantes en estos sustratos. La fermentación espontánea se lleva a cabo generalmente por los microorganismos mejor adaptados a las condiciones de fermentación. El comienzo de un proceso de fermentación espontánea requiere un tiempo relativamente largo lo que puede llevar a paradas de fermentación que pueden deteriorar el alimento y/o favorecer la supervivencia de patógenos generando un riesgo para la salud del consumidor. Por ello, desde el punto de vista

higiénico y de la seguridad alimentaria, se recomienda el uso de cultivos iniciadores, que producen una rápida acidificación del producto y con ello la inhibición del crecimiento de bacterias patógenas o de aquellas que puedan causar el deterioro del producto (Hugenholtz, 2008). Aunque en las fermentaciones de alimentos cárnicos se utilizan una gran variedad de especies de bacterias lácticas como cultivos iniciadores, en el caso de la fermentación de sustratos de origen vegetal se emplean pocas especies bacterianas. Comparando la diversidad de especies que forman parte de las bacterias lácticas con la microbiota que se ha observado en los sustratos vegetales fermentables es posible establecer que solo unas pocas especies parecen estar bien adaptadas para crecer en materiales orgánicos de origen vegetal donde los compuestos fenólicos son abundantes.

Lactobacillus plantarum es la especie de BAL utilizada con mayor frecuencia como cultivo iniciador en la fermentación de sustratos de origen vegetal como pepinos, coles y aceitunas (Rodriguez, et al., 2009).

3.1. Metabolismo de ésteres fenólicos en bacterias lácticas

Las bacterias del ácido láctico, se encuentran presentes en una gran variedad de sustratos vegetales y productos agroalimentarios. En estos sustratos, los compuestos fenólicos en general y los ésteres fenólicos en particular, son abundantes y tienen gran importancia por su influencia en sus características nutricionales y sensoriales. De esta forma, ciertas especies de *Lactobacillus* son intrínsecamente más tolerantes a los compuestos fenólicos cuando se comparan con *Escherichia coli* o *Bacillus subtilis* (Sanchez-Maldonado, et al., 2011).

Sin embargo, hasta el momento existen pocos estudios relacionados con el metabolismo de compuestos fenólicos por bacterias lácticas y sólo se han realizado en *Oenococcus oeni*, *Pediococcus pentosaceus* y algunas especies de *Lactobacillus* (*L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. paracollinoides*, *L. collinoides* y *L. brevis*) (Sanchez-Maldonado, et al., 2011) (Buron, et al., 2011, Knockaert, et al., 2012). Se han descrito enzimas con actividad feruloil esterasa en BAL

aisladas de alimentos y de la microbiota del tracto gastrointestinal humano, como algunas cepas de *Lactobacillus gasseri* (Couteau, et al., 2001), *Lactobacillus acidophilus* (Wang, et al., 2004), *Lactobacillus helveticus* (Guglielmetti, et al., 2008) y *Lactobacillus johnsonii* (Bel-Rhlid, et al., 2009) (Lai, et al., 2009) (Bel-Rhlid, et al., 2012). Esta actividad enzimática puede proporcionar a estas cepas de *Lactobacillus* una ventaja ecológica, ya que a menudo se asocian con fermentaciones de sustratos vegetales.

3.1.1. Metabolismo de ésteres fenólicos en *L. plantarum*

La especie *L. plantarum* es heterofermentativa (Siezen y van Hylckama Vlieg, 2011), presenta uno de los genomas más grandes dentro de las BAL y presenta un metabolismo muy versátil (Kleerebezem, et al., 2003). Tal y como se ha señalado anteriormente, *L. plantarum* lleva a cabo la fermentación de sustratos vegetales, donde los ésteres fenólicos son abundantes. La mayoría de las enzimas implicadas en el metabolismo de compuestos fenólicos en *L. plantarum* permanecen desconocidas hasta la fecha (Rodríguez, et al., 2009). Entre dichas enzimas se encuentran las responsables del metabolismo de ésteres fenólicos como las arilesterasas y las feruloil esterasas (Figura 7).

Entre las esterasas, las arilesterasas presentan un elevado interés biotecnológico teniendo en cuenta que no sólo actúan sobre ésteres alifáticos, sino que también actúan sobre ésteres fenólicos, modulando el perfil de ésteres de los alimentos. Las arilesterasas se han estudiado menos que otras esterasas como las carboxilesterasas o las lipasas (Park, et al., 2008). Hasta la fecha, la mayoría de las arilesterasas descritas se han aislado de mamíferos, donde juegan un papel importante en la detoxificación de compuestos organofosforados. Sin embargo, existe poca información genética y bioquímica de las arilesterasas bacterianas, cuya función fisiológica permanece desconocida. Se han descrito arilesterasas bacterianas en *Vibrio mimicus* (Shaw, et al., 1994), *Agrobacterium radiobacter* (Sakai, et al., 1998), *Acinetobacter* sp. (Jones, et al., 1999), *Pseudomonas fluorescens* (Cheeseman, et al., 2004), *Sulfolobus solfataricus* (Park, et al., 2008) y

Gluconobacter oxydans (Navarro-Gonzalez, et al., 2012). Entre las BAL, únicamente se han descrito arilesterasas de *Lactobacillus helveticus* (Fenster, et al., 2000) y *Lactobacillus casei* (Fenster, et al., 2003).

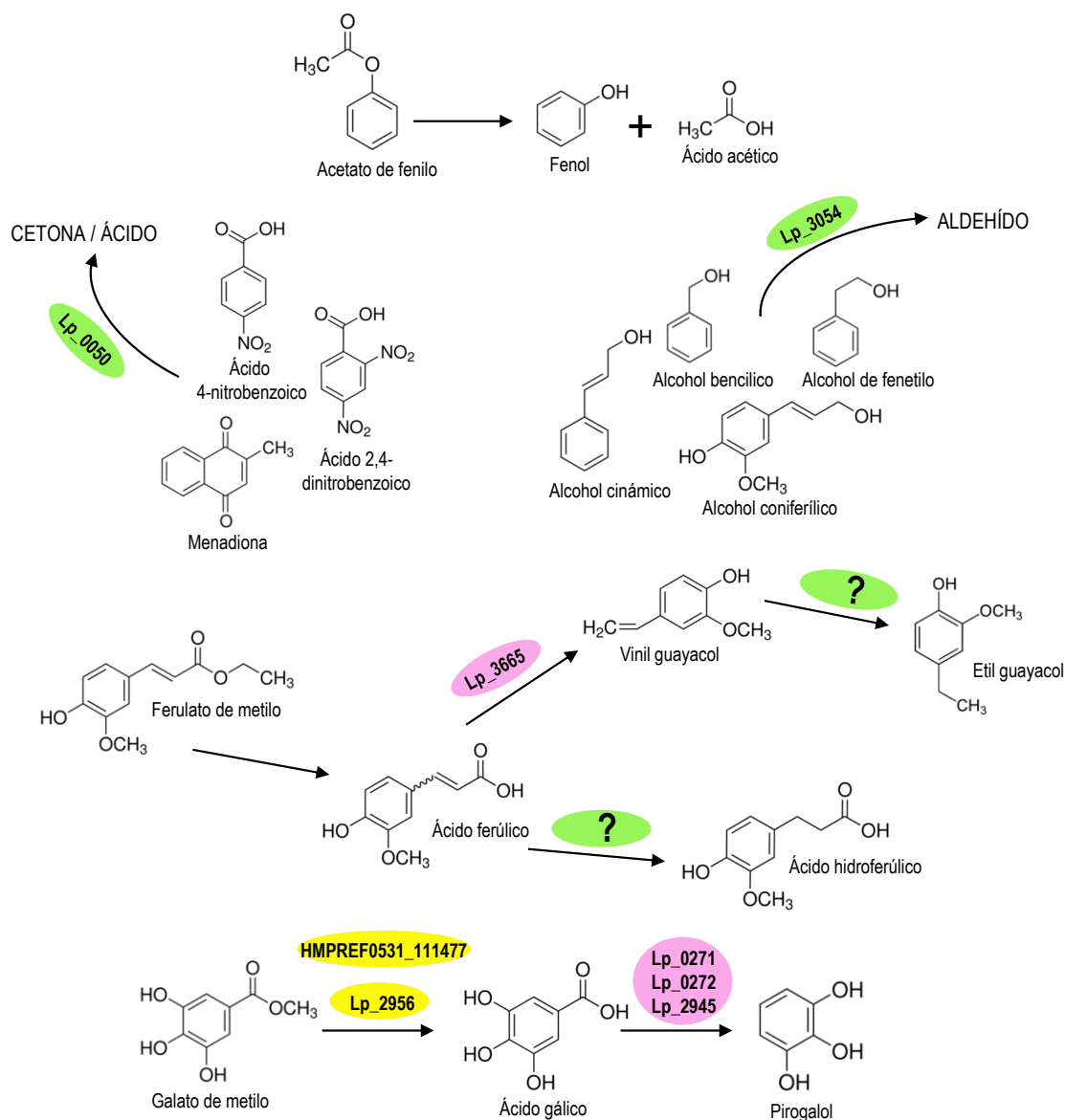


Figura 7. Metabolismo de compuestos fenólicos en *L. plantarum*.

Por otro lado, las feruloil esterasas son las enzimas implicadas en la liberación de ácidos fenólicos como el ácido ferúlico, p-cumárico, cafeico y sinápico de las paredes celulares vegetales (Benoit, et al., 2008). En el proceso

de digestión humana y de rumiantes, las feruloil esterases son importantes para hidrolizar los ésteres de la fibra de la dieta, liberando hidroxicinamatos y derivados que presentan efectos positivos como antioxidante, antiinflamatorio y actividad antimicrobiana (Faulds, 2010). Además, dichas esterases en la fermentación llevada a cabo en el colon, donde la actividad de la microbiota presente hidroliza los enlaces éster de los ésteres fenólicos (Faulds, 2010). Las propiedades biológicas de los derivados hidroxicinámicos dependen de su absorción y metabolismo. A pesar de que existen evidencias del metabolismo de ésteres de ácidos hidroxicinámicos por la microbiota intestinal, sólo está disponible una limitada información de los microorganismos y las enzimas implicadas en su degradación.

Se han descrito enzimas con actividad feruloil esterasa en BAL aisladas de alimentos y de la microbiota del tracto gastrointestinal humano, como algunas cepas de *Lactobacillus gasseri* (Couteau, et al., 2001), *Lactobacillus acidophilus* (Wang, et al., 2004), *Lactobacillus helveticus* (Guglielmetti, et al., 2008) y *Lactobacillus johnsonii* (Bel-Rhliid, et al., 2009) (Lai, et al., 2009) (Bel-Rhliid, et al., 2012). Esta actividad enzimática puede proporcionar a estas cepas de *Lactobacillus* una ventaja ecológica, ya que a menudo se asocian con fermentaciones de sustratos vegetales.

L. plantarum es una de las especies de BAL que se encuentran con mayor frecuencia en fermentaciones de sustratos vegetales y además puede colonizar el tracto gastrointestinal humano considerablemente mejor que otros lactobacilos estudiados (Johansson, et al., 1993). A pesar de que se han descrito varias enzimas con actividad esterasa en *L. plantarum*, hasta la fecha no se ha descrito actividad arilesterasa y feruloil esterasa, pese al interés que presentan estas enzimas en alimentos.

En 1968 se describió por primera vez la presencia de actividad esterasa en *L. plantarum* (Oterholm et al., 1968) cuando una cepa de esta especie presentó la mayor actividad esterasa entre las bacterias lácticas aisladas durante la elaboración del queso Cheddar. Posteriormente, se purificó parcialmente una enzima con actividad acetilesterasa a partir de esta cepa (Oterholm et al., 1972) la cual, utilizando triacetina como sustrato, presentó actividad óptima a pH 6.7 y 40 °C. Además, se comprobó que la actividad de

esta esterasa disminuía según aumenta la longitud de la cadena del ácido graso (triacetina > tripropionina > tributirina). Casi treinta años después, en 1995, Andersen et al. (1995) purificaron parcialmente y caracterizaron una esterasa a partir de una cepa de *L. plantarum* aislada de una carne fermentada espontáneamente. La enzima, de 75 kDa, presentó actividad óptima a 37 °C utilizando tributirina como sustrato. De manera similar, se aislaron cepas de *L. plantarum* con actividad esterasa entre las cepas de la colección del *National Dairy Products Research* (Cork, Irlanda) (Gobbetti et al., 1996, 1997). A partir de una de estas cepas, *L. plantarum* 2739, se purificó y caracterizó una esterasa intracelular, la esterasa E2 (Gobbetti et al., 1996). Esta esterasa, un monómero de 65 kDa, presentó actividad óptima a pH 7.5 y 35 °C. Entre los triglicéridos ensayados, presentó la mayor actividad en tributirina, aunque también se hidrolizaron trilaurina, tripalmitina y los ésteres de β -naftilo de los ácidos grasos de C2 a C12, especialmente el butirato de β -naftilo (Gobbetti et al., 1996). Posteriormente estos autores describieron que el sistema esterolítico o lipolítico intracelular de *L. plantarum* es muy complejo (Gobbetti et al., 1997). *L. plantarum* produce dos enzimas mayoritarias que hidrolizan enlaces ésteres carboxílicos con diferente especificidad. Mediante DEAE celulosa, de la esterasa purificada previamente, E2, se consiguió separar una segunda esterasa, E1, y una esterasa minoritaria. Mediante cromatografía en Sephacryl se consiguieron separar otras esterazas minoritarias a partir de E2. En esta ocasión la esterasa E2 se comportó como un monómero de 85 kDa con actividad óptima a pH 7 y 35 °C sobre los ésteres de β -naftilo de los ácidos grasos de C2 a C12, especialmente el butirato de β -naftilo, aunque también hidrolizó la tributirina y, en menor medida, la tricaprilina. La enzima E1 parcialmente purificada fue más activa en tributirina que la enzima E2. Mediante degradación de Edman se determinó la secuencia de los 15 primeros aminoácidos del extremo N-terminal la enzima E2 purificada (SNEHTQEVNQTVAD) (Gobbetti et al., 1997). Sin embargo, no se realizó la purificación y caracterización de todas las esterazas detectadas. Contrariamente a las esterazas intracelulares descritas en la cepa *L. plantarum* 2739, en *L. plantarum* DSMZ 12028 se han descrito lipasas extracelulares (Lopes et al., 1999a, 1999b, 2002). Se ha descrito que esta cepa produce cuatro lipasas extracelulares, de 45 a 98 kDa, capaces de hidrolizar aceite de

oliva, compuesto mayoritariamente por trioleína. Estas enzimas se purificaron parcialmente y se comprobó que poseían una secuencia N-terminal muy similar, por lo que se supuso que se habían originado mediante una degradación proteolítica. Los resultados obtenidos sugieren que existe una metaloproteasa implicada en el procesamiento de las lipasas extracelulares de *L. plantarum* (Lopes et al., 1999). Recientemente, basándose en la secuencia del genoma de la cepa *L. plantarum* WCFS1, se identificó una ORF, *lp_0973*, anotada como posible esterasa. A partir de la cepa de *L. plantarum* ATCC 8014 se clonó y expresó este gen, y se purificó y caracterizó la proteína producida (Brod et al. 2010). La proteína, de 38 kDa, presentó actividad óptima a pH 6.0 y 40 °C. De los sustratos probados, presentó mayor actividad en butirato de *p*-nitrofenilo, aunque también hidrolizó eficazmente acetato de *p*-nitrofenilo. Mediante dicroísmo circular se estudió la estructura secundaria de esta proteína y se comprobó que presenta un plegamiento de tipo α/β (Brod et al., 2010).

Tabla1. Esterasas descritas en *L. plantarum*

Cepa/enzima	Peso molecular (kDa)	Sustratos	Temperatura/pH óptimos	Referencia
<i>L. plantarum</i> / acetilesterasa		Triacetina	40 °C/6,7	(Oterholm, et al., 1968)
<i>L. plantarum</i> MF32/ esterasa	75	Tributirina	37 °C	(Andersen, et al., 1995)
<i>L. plantarum</i> 2739/ esterasa E2	65	Tributirina, trilaurina y tripalmitina	35 °C/7,5	(Gobbetti y Fox, 1996)
<i>L. plantarum</i> 2739/ tributirín esterasa E1	85	Tributirina y tricaprilina	35 °C/7,0	(Gobbetti, et al., 1997)
<i>L. plantarum</i> DSMZ 12028/ lipasas	45-98	Aceite de oliva		(Lopes Mde, et al., 1999, Lopes Mde, et al., 2002, Silva Lopes Mde, et al., 1999)
<i>L. plantarum</i> ATCC 14917 ^I / tanasa (TanB _{Lp})	50	Ésteres del ácido gálico y protocatéquico	40 °C/7,0	(Curiel, et al., 2009)
<i>L. plantarum</i> ATCC 8014/ esterasa	38	Acetato y butirato de <i>p</i> -nitrofenilo	40 °C/6,0	(Brod, et al., 2010)
<i>L. plantarum</i> ATCC 14917 ^T / tanasa (TanA _{Lp})	67	Ésteres del ácido gálico y protocatéquico	30 °C/6,0	(Jimenez, et al., 2014)

OBJETIVOS

De la potencialidad enzimática que posee *L. plantarum* para metabolizar los numerosos ésteres fenólicos presentes en los alimentos, tan sólo se han caracterizado a nivel genético y molecular dos esterasas de ácidos hidroxibenzoícos (ácido gálico y ácido protocatéquico) TanA_{Lp} (Jiménez et al., 2014) y TanB_{Lp} (Curiel et al., 2009), permaneciendo completamente desconocidas, tanto a nivel bioquímico como genético, el resto de enzimas con actividad esterasa de ácidos fenólicos en *L. plantarum*. Las enzimas con actividad arilesterasa y feruloil esterasa constituyen un grupo interesante de esterasas de ácidos hidroxicinámicos con importantes aplicaciones en la industria alimentaria. *L. plantarum* se encuentra en sustratos vegetales ricos en ésteres hidroxicinámicos. La secuencia completa del genoma de algunas cepas de *L. plantarum* ha revelado que existen numerosos genes que codifican proteínas anotadas como posibles esterasas que no se han caracterizado en la actualidad. Teniendo en cuenta estos antecedentes, y con el fin de aumentar el conocimiento sobre el metabolismo de compuestos fenólicos en *L. plantarum*, y más concretamente en el metabolismo de ésteres de ácidos hidroxicinámicos, se han propuesto los siguientes objetivos:

1. Estudio del metabolismo de ésteres hidroxicinámicos en *L. plantarum*.
2. Identificación de proteínas implicadas en la degradación de ésteres hidroxicinámicos en *L. plantarum*.
3. Caracterización bioquímica de arilesterasas y feruloil esterasas.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Estirpes bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos

Para el desarrollo de este trabajo se han empleado las estirpes bacterianas y los plásmidos indicados en las Tablas 2 y 3 respectivamente, así como los oligonucleótidos sintéticos descritos en la Tabla 4.

Tabla 2. Estirpes bacterianas empleadas en este trabajo.

Estirpe ^a	Genotipo/Fenotipo relevante	Referencia/Origen ^b
<i>Escherichia coli</i>		
DH10B	F ⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80dlacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 deoR araD139 Δ(ara leu)7697 galU galK rpsL nupG λ ⁻	Durfee et al., 2008
BL21 (DE3)	fhvA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] ΔhsdS λ DE3 = λ sBamHlo ΔEcoRI-B int:: (lac::PlacUV5::T7 gene 1) i21 Δnin5 T1	Studier et al., 1990/Novagen
<i>Lactobacillus plantarum</i>		
WCFS1 (NCIMB 8826)	Cepa salvaje	Kleerebezem et al., 2003/NCIMB
WCFS1 Δ/p_0796	Derivada de WCFS1; Δ/p_0796	Este estudio
WCFS1 Δtanlp1	Derivado de WCFS1; Δtanlp1	Curiel, 2010
WCFS1 ΔPAD	Derivado de WCFS1; ΔPAD	Este estudio
WCFS1 ΔtanLpB (pNZ:TuR-1092)		Este estudio
WCFS1 ΔPAD (pNZ:TuR-1092)		Este estudio
WCFS1 (pNZ:TuR-1092)		Este estudio
NC8	Cepa salvaje	(Axelsson et al., 2012)/
57/1	Cepa salvaje	Dr. L. Axelsson (Nofima)
CECT 220 (ATCC 8014), CECT 221 (ATCC 14431), CECT 223, CECT 224, CECT 749 (ATCC 10241), CECT 4185, CECT 4645	Cepa salvaje	Dr. J. L. Ruiz-Barba (IG)
DSM 1055, DSM 2648, DSM 10492, DSM 13273, DSM 20246	Cepa salvaje	CECT
RM28, RM31, RM34, RM35, RM38, RM39, RM40, RM41, RM71, RM72, RM73	Cepa salvaje	DSMZ
<i>L. plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> CECT 748 ^T (ATCC 14917 ^T)	Cepa tipo	De las Rivas et al., 2009/IFI
<i>L. plantarum</i> subsp. <i>argenteroantensis</i> DSM 16365 ^T	Cepa salvaje	CECT
<i>Lactobacillus paraplantarum</i> DSM 10641 (ATCC 10776), DSM 10667 ^T	Cepa salvaje	DSMZ
<i>Lactobacillus pentosus</i> DSM 16366, DSM 20199, DSM 20314 ^T	Cepa salvaje	DSMZ
<i>Lactococcus lactis</i>		
MG 1363	Cepa salvaje libre de plásmidos derivados de NCDO 712	Gasson et al., 1983
MG 1363 pNZ8048		Este estudio
MG 1363 pNZ8048-PR-JDM1_1092		Este estudio
MG 1363 pNZ8048-TuB-JDM1_1092		Este estudio
MG 1363 pNZ8048-TuR-JDM1_1092		Este estudio

^{aT}, cepa tipo

^b NCIMB, National Collections of Industrial, Marine and Food Bacteria, Scotland, UK; Nofima, Norwegian Institute of Food, Fisheries and Aquaculture Research, Norway; CECT, Colección Española de Cultivos Tipo ; DSMZ, German Collection of Microorganisms and Cell Cultures; IG, Instituto de la Grasa; IFI, Instituto de Fermentaciones Industriales

Tabla 3. Plásmidos empleados en este trabajo.

Plásmido	Genotipo/Fenotipo relevante ^a	Referencia/Origen
pURI2-TEV	derivado de pIN-III (lpp ^P -5A3), Amp ^r	Curiel et al., 2011
pURI3-TEV	derivado de pT77, Amp ^r	Curiel et al., 2011
pURI3-TEV- <i>lp_0796</i>	Amp ^r	Este estudio
pURI3-TEV- <i>lp_0973</i>	Amp ^r	Este estudio
pURI3-TEV- <i>lp_1002</i>	Amp ^r	Este estudio
pURI3-TEV- <i>lp_1358</i>	Amp ^r	Este estudio
pURI3-TEV- <i>lp_1758</i>	Amp ^r	Este estudio
pURI3-TEV- <i>lp_1760</i>	Amp ^r	Este estudio
pURI3-TEV- <i>lp_2923</i>	Amp ^r	Este estudio
pURI3-TEV- <i>lp_2953</i>	Amp ^r	Este estudio
pURI3-TEV- <i>lp_2660</i>	Amp ^r	Este estudio
pURI3-TEV- <i>lp_3505</i>	Amp ^r	Este estudio
pURI3-TEV- <i>lp_3561</i>	Amp ^r	Este estudio
pURI3-TEV- <i>lp_3562</i>	Amp ^r	Este estudio
pURI3-Cter	Amp ^r	Curiel et al., 2011
pURI3-Cter- <i>lp_2923</i>	Amp ^r	Este estudio
pURI3-Cter- <i>lp_2953</i>	Amp ^r	Este estudio
pURI3-Cter- <i>lp_2953</i> optimizado	Amp ^r	Este estudio
pURI3-Cter- <i>lp_1328</i>	Amp ^r	Este estudio
pURI3-Cter- <i>lp_3561</i>	Amp ^r	Este estudio
pURI3-Cter- <i>JDM1_1092</i>	Amp ^r	Este estudio
pEX-A- <i>lp_2953</i>	Amp ^r	Este estudio/Eurofins MWG Operc
pUCE191	derivado de pUC19, Amp ^r , Em ^r	Arrecubieta et al., 1995
pUCE191- <i>lp_0796</i>	Amp ^r , Em ^r	Este estudio
pUCE191- <i>JDM1_1092</i>	Amp ^r , Em ^r	Este estudio
pGRO7	Cm ^r	Takara
pNZ:TuR	Cm ^r	Este estudio
pNZ:TuR-1092	Cm ^r	Este estudio

^a Amp^r, resistente a ampicilina; Em^r, resistente a eritromicina; Cm^r, resistente a cloranfenicol.

Tabla 4. Oligonucleótidos empleados en este trabajo.

Oligonucleótido	Secuencia (5'→3')
563	GTGAAAACCTGTATTTCCAGGGCATGCCAACAATTAATTTCGATTCAAA
564	ATCGATAAGCTTAGTTAGCTATTACTAAATTAACGCGGCCGCCATCACT
565	GGTGAAAACCTGTATTTCCAGGGCATGCAAGTTATTAAGCAAAAATTAA
566	ATCGATAAGCTTAGTTAGCTATTACTAACGATTATCAGCTAGCCATTCA
567	GGTGAAAACCTGTATTTCCAGGGCATGATCAAAGTTACTAACCGACACT
568	ATCGATAAGCTTAGTTAGCTATTATTAATTTAAATAATAATCGAAGAAA
569	GAAAACCTGTATTTCCAGGGCATGGTGCGGACGACCAAATTTGGTG
570	ATCGATAAGCTTAGTTAGCTATTATTATTTAAGAATGTTGGTCTCCAAG
571	GGTGAAAACCTGTATTTCCAGGGCATGCAAGTTGAACAGCGCACATTAA
572	ATCGATAAGCTTAGTTAGCTATTATCAATAATTACCAGCTAACAAATCCC
573	GGTGAAAACCTGTATTTCCAGGGCATGAGATATGAGCAATTGAGATTAA
574	ATCGATAAGCTTAGTTAGCTATTACTATTTAAAGTCCACTTGCGTCAAA
575	GGTGAAAACCTGTATTTCCAGGGCATGGAGATACGCACACTAGCTTTAA
576	ATCGATAAGCTTAGTTAGCTATTACTAAATTTTCAGTACTATTCTTGCTA
597	GGGTAATCGGCCACATTGG
598	CTGCTGCCTCCCGTAGGA
677	GGTGAAAACCTGTATTTCCAGGGCATGGCACTGATTTCGTATTAATTTTA
678	ATCGATAAGCTTAGTTAGCTATTATCAATTAGCTTTAATATGCCAGAA
679	GGTGAAAACCTGTATTTCCAGGGCATGTCAATTCATAGCAATAACTTTT
680	ATCGATAAGCTTAGTTAGCTATTATTAACATTGCGCCAACCTCCCTTA
681	GGTGAAAACCTGTATTTCCAGGGCATGATATCAAAAGAATTGAGTCGGT
682	ATCGATAAGCTTAGTTAGCTATTATCAGGCCATATGTTCTGCAAAAAG
703	GGTGAAAACCTGTATTTCCAGGGCATGATGCTGAAACAACCGGAACCGT
704	ATCGATAAGCTTAGTTAGCTATTATCATTTATAAATAGTTTTTAAATAT
705	GGTGAAAACCTGTATTTCCAGGGCATGCCAAATATGTCGTTGATTTATG
706	ATCGATAAGCTTAGTTAGCTATTATTACATGGCTGCCCGGACTTGTTGG
707	GGTGAAAACCTGTATTTCCAGGGCATGCTTACTCAAATTATTGCTCATC
708	ATCGATAAGCTTAGTTAGCTATTATTAACCTCCTTGACCTGCTTACGA
856	TAACCTTAAGAAGGAGATATACATATGCAAGTTGAACAGCGCACATTAA
857	GCTATTAATGATGATGATGATGATGATAATTACCAGCTAACAATCCCTG
878	CTGGTACCAAGTGGCATTGTTG
879	TGTCTAGATGCCTTCGTCTAGC
910	CTGGTGCTGCTAAGGCTCTTG
911	TGTGCATGGCCTTGTAATTTACC
912	TCCGGAAGCAGTCGTCAAG
913	TCGCCGGCAAGTCAATGT
914	CCCGACAGCAACGTCTTCA
915	GGCAGCTGGCGTTTGTTT
916	CGGATCCGCCAAATCG
917	CGTGATGGGTGGCGTAACTT
918	AACCGCGACAATGTTTTGATT
919	TTGTGAACGGCAGTTTCAGTGT
922	CGGCGGGCAGAACAGAT
923	GATCCGGACACGGTTACCAA
957	TAACCTTAAGAAGGAGATATACATATGAGATATGAGCAATTGAGATTAA
958	GCTATTAATGATGATGATGATGATGTTTAAAGTCCACTTGCGTCAAATC
959	TAACCTTAAGAAGGAGATATACATATGCAAGTTATTAAGCAAAAATTAA
960	GCTATTAATGATGATGATGATGATGACGATTATCAGCTAGCCATTCAAG
961	TAACCTTAAGAAGGAGATATACATATGCCAAATATGTCGTTGATTTATG
962	GCTATTAATGATGATGATGATGATGCATGGCTGCCCGGACTTGTTGGGC

977 GCCAACATGCCGTCATTTTA
 978 CCGCACATCATTGGCACTT
 979 CAGCTTAGCGCCAGAAGCA
 980 TCGCGAGCCCGTCTAAAA
 981 CCTTGCGAATGCACAAACAG
 982 GCGACGTGCGGCTGAT
 983 GCGGGCCTACGCCATT
 984 CGCCGAAGTCAAAAAAGCA
 985 AACGGGTCGGATTGTGGAT
 986 CACCAGCGTCCAATTGCTT
 987 TGCAACCGGAAACCATCAA
 988 CATCCTCAGTACCATGCCAAAA
 989 CGCAGCCCACGGTAGTTG
 990 GCCACCGGTTCTGGTGAA
 991 CACCAGCGTGACCAAACCTTTT
 992 CAGCGCCCCGTAACCA
 993 TTGGGCGTTGCAGCAAT
 994 CGCCTGGGTGTAATCCA
 1005 CATTGAAGTCAAAACGCAGAACTG
 1006 GCAATTGGCGCAAGCATT
 1025 CGCAACGTCGTGGTTACG
 1026 TCGGTATTGCGTTGCCAGTA
 1027 GGTCTTAGGTTACCCGGTTATCG
 1028 AGGCCTCTTCTCGACTTTTCG
 1029 CGCAAGAGTTAGTCACGAGTCAA
 1030 TCCGCGTTGCCCAAAT
 1031 TCCTCGCGGGCATGTT
 1032 CCGTCGCTTGTTGTGCTAATT
 1042 GGTGAAAACCTGTATTTCCAGGGCATGGCTGCAGCAGTTGAAATGAACA
 1043 AAGCTTAGTTAGCTATTATGCGTATTAAGCCTTTAAGAGTTTTTCAACT
 1090 CTGGAACCTAGAGGGTATTAATAATGACATCGATGGAATTTAAGATTA
 1091 TAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACATCGATGGAATTTAAGATTA
 1092 GCTATTAATGATGATGATGATGATGTTTAAACGCGGCCAGTGCTAATTG
 1220 TAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGATCAAAGTTACTAACCGACACT
 1221 GCTATTAATGATGATGATGATGATGATTTTAAATAATAATCGAAGAAATT
 1230 TAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGATATCAAAAAGATTGAGTCGGT
 1231 GCTATTAATGATGATGATGATGATGGGCCATATGTTCTCGCAAAAAGCG
 1254 TAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACAACACGCAAAAAATGG
 1255 GCTATTAATGATGATGATGATGATGCTTCAAATATTTGCCATGA
 1256 CTTTAAGAAGGAGATAATACATATGCAGAACCAAGCGTGGCTGAA
 1257 CGTTGCTGGCGATGCGGCTGGCGC
 1258 GCGCCAGCCGCATCGCCAGCAACG
 1259 GGCGAGTTTGCTCCCTTCGG
 1260 CGGAAGGGAGCAAACCTCGCC
 1261 GCTTGAACGCCGCTTTCGCACC
 1262 GGTGCGAAAGCGGCGTTCAAGC
 1297 GCCTGACCGGTTGGACTATCT
 1298 GGCTACGCGGCGAAT
 1350 GATTACCGTTGCTGGCGCTTCGGCTGGCGC
 1351 GCGCCAGCCGAAGCGCCAGCAACGGTAATC
 1352 GCAACAAATCTGAATCAAGAACTCGGTAGC
 1353 GCTACCGAGTTCTTGATTGAGATTTGTTGC
 1387 ATGGTACCAAGATACGCAACAAGC
 1388 CATCTAGATCTGTTACGCTCGG


```

1389      ACGGTACCGGTCTACTTCCACG
1390      CGTCTAGATGCTGTCAAGTTGC
1391      TGGGTACCAAGGAGCAGATGG
1392      TCTCTAGAGCTACCCAGCTTGC
1421      CACCACTAKAKGCTGGTAATCG
1422      CGATTACCAGCMTMTAGTGGTG
1423      CCACTATTTGCTKAKAATCGTAGTG
1424      CACTACGATTMTMAGCAAATAGTGG
1425      CACCACTAKAKGCTKAKAATCGTAGTGACG
1426      CGTCACTACGATTMTMAGCMTMTAGTGGTG
1427      GGTAATCGTAGTGACKAKGCTGA
1428      TCAGCMTMGTCACCTACGATTACC
1429      CGTTGCTGAAATGKAKATCACGC
1430      GCGTGATMTMCATTTTCAGCAACG
1431      CGTTGCTGAAGCGKAKATCACGC
1432      GCGTGATMTMCGCTTCAGCAACG
1466      TAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGACCTCGATGGAGTTCAAG
1467      GCTATTAATGATGATGATGATGATGTTTGAAAGCCGCCAGTGCCA

```

2. Medios y condiciones de cultivo

Las cepas se conservaron congeladas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en el medio de cultivo al que se añadió glicerol estéril al 10% (concentración final). En el momento de sembrarlas, se descongelaron y se cultivaron en los medios correspondientes. Las especies de bacterias lácticas, de manera general, se cultivaron en medio MRS (Pronadisa, España) a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ sin agitación. *Lactococcus lactis* se cultivó en medio M17 (Oxoid) suplementado con glucosa al 0,5% (concentración final) (GM17) a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ sin agitación. Para los cultivos en medio sólido se añadió agar al 1.5%. En los ensayos de degradación de compuestos fenólicos, con el fin de evitar las trazas de estos compuestos presentes en medios no definidos, las cepas del género *Lactobacillus* se cultivaron en un medio basal modificado (RPM) descrito previamente para *L. plantarum* (Rozes y Pères, 1998) en el que se sustituyó la glucosa por galactosa para evitar una posible represión por catabolito (Muscariello, et al., 2001). Este medio de cultivo consta de: galactosa 2 g/L, citrato trisódico dihidratado 0,5 g/L, ácido D, L-málico 5 g/L, casaminoácidos 1 g/L y yeast nitrogen base 6,7 g/L, ajustado a pH 5,5. En estos ensayos de degradación, el compuesto fenólico se añadió al medio a una

concentración final de 1 mM, manteniéndose el cultivo durante 7 días en las mismas condiciones.

La concentración final de antibiótico utilizada para el cultivo de cepas resistentes fue 10 µg/mL para eritromicina y 100 µg/mL para lincomicina. En algunos casos, se utilizó cloranfenicol a una concentración final de 8 µg/mL.

Las cepas de *Escherichia coli* se cultivaron rutinariamente a 37 °C con agitación en medio líquido Luria-Bertani (LB) (Sambrook, et al., 1989) o añadiendo agar al 1,5% para los cultivos en medio sólido. Cuando se requirió, se añadió ampicilina al medio a una concentración final de 100 µg/mL y cloranfenicol a 20 µg/mL. En algunas ocasiones, para los ensayos de expresión de proteínas las cepas de *E. coli* se cultivaron en las mismas condiciones en el medio mínimo M9 (Sambrook, et al., 1989). Este medio de cultivo consta de: Na₂PO₄ 3 g/L, KH₂PO₄ 1,5 g/L, NH₄Cl 0,5 g/L, NaCl 0,25 g/L y CaCl₂ 1,5 mg/L. El medio se suplementó con D-glucosa al 0,4% (fuente de carbono), MgSO₄ 1 mM, tiamina 0.5 mg/L y FeSO₄ 4,2 mg/L.

3. Técnicas de DNA

3.1. Extracción de DNA cromosómico

El DNA cromosómico de las bacterias lácticas se aisló utilizando el siguiente protocolo. Las bacterias se cultivaron en 10 mL de medio MRS a 30 °C durante 20 h. Posteriormente, los cultivos se centrifugaron a 12500 x g durante 5 min. Las células sedimentadas se lavaron una vez en 500 µL de TES (Tris HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1mM; NaCl 100 mM). El sedimento se resuspendió en 600 µL de solución TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM) conteniendo 10 mg/mL de lisozima (Sigma, Alemania) y se incubó durante 30 min a 37 °C.

Para producir la lisis celular, se adicionaron 70 µL de SDS al 10% y 10 µL de proteinasa K (20 µg/mL) (Sigma, Alemania) y se incubó a 37 °C durante 30 min. Una vez lisado el cultivo, el DNA se desproteinizó mediante dos

extracciones con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y una extracción con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1).

Para precipitar el DNA cromosómico, se añadieron dos volúmenes de etanol frío (-20 °C) y el tubo se agitó lentamente hasta que apareció el DNA como un precipitado. El DNA precipitado se lavó con etanol al 70% y se dejó secar al aire. Finalmente, el DNA se disolvió en tampón TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; 1 mM EDTA) (Sambrook, et al., 1989).

3.2 Extracción de DNA plasmídico

Para comprobar que las células se han transformado con los plásmidos recombinantes que contienen los genes de interés, se realizó un método rápido de extracción de plásmidos de *E. coli* a partir de colonias crecidas en medio sólido.

Para llevar a cabo la extracción del DNA plasmídico, la colonia se cogió con una punta estéril y se resuspendió en 20 µL de una solución con lisozima 0,5 mg/mL; EDTA 25 mM pH 8,0; Tris HCl 25 mM pH 7,5; RNasa 0,1 mg/mL, azul de bromofenol 0,02% y glicerol 0,015%. La preparación se incubó a temperatura ambiente durante 15 min, posteriormente se añadieron 5 µL de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y se mezcló vigorosamente. La mezcla se centrifugó a 12500 x g durante 2 min para que se separaran las dos fases. De la fase superior acuosa, que contiene el DNA, se cargaron 10 µL en un gel de agarosa y se realizó una electroforesis convencional.

Las células transformadas con los plásmidos recombinantes se seleccionaron mediante la diferencia de tamaño con respecto al DNA plasmídico original debido a la presencia de los genes clonados en su interior.

Para obtener DNA plasmídico de mayor pureza, se realizó la extracción con el sistema comercial *High Pure Plasmid Isolation Kit* (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.3. Amplificación de secuencias de DNA mediante PCR

Para llevar a cabo la amplificación de DNA, los reactivos empleados se adquirieron a las casas comerciales Applied Biosystems y Takara

biotechnology, excepto los oligonucleótidos que se sintetizaron en MWG Operon Technologies.

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un volumen final de 25 o 50 μL , conteniendo una DNA polimerasa termoestable, tampones de reacción, desoxinucleótidos (dNTPs), DNA molde y los oligonucleótidos utilizados como cebadores.

En las reacciones de PCR se han utilizado las siguientes DNA polimerasas: *AmpliTaq Gold*TM (Applied Biosystems), a una concentración final de 0,025 U/ μL y *PrimeSTAR*TM HS (Takara) a una concentración final de 1,25 U/ μL (Takara), siguiendo las instrucciones suministradas por los proveedores. Se han utilizado los tampones de reacción recomendados para cada una de las polimerasas empleadas.

Cuando se utilizó la enzima *AmpliTaq Gold*TM se empleó MgCl_2 a una concentración 2 mM en la mezcla final, el tampón de reacción compuesto por Tris-HCl 10 mM, pH 8,3; KCl 50 mM y los dNTPs a una concentración final de 0,25 mM. En los casos en los que se utilizó la polimerasa *PrimeSTAR*TM HS se utilizó un tampón de reacción con MgCl_2 5 mM en la mezcla final y una concentración final de dNTPs de 0,2 mM. En todos los casos los oligonucleótidos se utilizaron a una concentración final de 1 μM y, por último, el DNA molde conteniendo la secuencia que se pretende amplificar. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo indistintamente en los termocicladores *Personal* y *Mastercycler gradient* (Eppendorf).

Las reacciones de PCR consistieron en 30 ciclos de tres fases cada uno: fase de desnaturalización del DNA (95 °C durante 30 segundos para *AmpliTaq Gold*TM y 98 °C durante 10 segundos para *PrimeSTAR*TM HS), una fase de hibridación de los oligonucleótidos cuya temperatura varía dependiendo del ensayo que se esté realizando, de 30 segundos para *AmpliTaq Gold*TM y de 5 segundos para *PrimeSTAR*TM HS y una fase de elongación o síntesis de DNA realizada a 72 °C durante un tiempo proporcional al tamaño del fragmento a amplificar. En la reacción realizada con la DNA polimerasa *AmpliTaq Gold*TM hubo que introducir una etapa previa de 95 °C durante 10 minutos para su activación puesto que esta enzima se suministra en estado inactivo.

3.4 Electroforesis de DNA en geles de agarosa

Para resolver las muestras de DNA se utilizaron geles de agarosa al 0,7% o 2% en tampón TAE (Tris-HCl 40 mM; ácido acético 20 mM; EDTA 2 mM, pH 8,0). El mismo tampón se utilizó como electrolito. A las muestras se les añadió un 20% de su volumen de una solución compuesta por azul de bromofenol al 0,25%, xilencianol FF al 0,25% y glicerol al 30% en agua. La electroforesis se realizó a 90 V y, una vez finalizada, los geles se tiñeron con *GelRedTM Nucleic acid Gel Stain* (Biotium) a una concentración final 3X en agua con NaCl 0,1 M. Los fragmentos de DNA se detectaron con radiación ultravioleta ($\lambda=302$ nm) en un transiluminador *ChemiDoc XRS⁺* (Bio-Rad). Como marcadores de tamaño, se utilizaron DNA del fago Lambda cortado con *EcoT14I* (Takara) y el marcador de 100 pb *ladder* (Biotools).

3.5 Purificación de DNA a partir de agarosa

La purificación de DNA a partir de un gel de agarosa se llevó a cabo mediante el kit *QIAquick Gel extraction* (QIAGEN) siguiendo las indicaciones suministradas por el proveedor.

3.6 Método de clonación independiente de ligación (LIC)

En esta tesis se utilizó la familia de vectores de expresión pURI (pURI3-TEV y pURI3-Cter) (Curiel, et al., 2011) para realizar la clonación de los genes de interés mediante el método de clonación independiente de ligación (LIC) descrito por De las Rivas y colaboradores (de las Rivas, et al., 2007).

Los vectores de expresión, pURI3-TEV y pURI3-Cter se basan en los vectores de expresión pURI3, derivados de pT7-7 (de las Rivas, et al., 2007). Estos vectores contienen una secuencia líder para la expresión de proteínas tras la región RBS, constituida por un residuo de metionina en el extremo amino terminal, seguida de tres aminoácidos espaciadores, una cola de afinidad de seis histidinas, un residuo espaciador que es una glicina y la secuencia de reconocimiento para la proteasa del virus del tabaco (TEV,

Tobacco Etch Virus) (ENLYFQG). Esta secuencia líder continúa con la metionina inicial de la proteína de interés, una región intergénica no codificante de 230 pb que contiene la diana de restricción *NotI* y finalmente cuatro codones de terminación en tándem. En el caso de los vectores pURI-Cter presentan la secuencia líder para la expresión de proteínas tras la región RBS, constituida por un residuo de metionina en el extremo amino terminal y la cola de afinidad que codifica seis residuos de histidina se localiza 280 pb tras ese residuo de metionina, seguida de cuatro codones de terminación en tándem.

Para llevar a cabo la clonación mediante el método LIC, los genes de *L. plantarum* se amplificaron con la DNA polimerasa *PrimeSTARTM HS* (Takara) utilizando los oligonucleótidos (Tabla 4) diseñados con extremos 5' complementarios a regiones presentes en los vectores de expresión. De esta manera, en una segunda amplificación utilizando el vector como molde y el gen amplificado como cebador, los extremos 5' hibridan en el plásmido, permitiendo a la enzima DNA polimerasa copiar el resto del plásmido y la consiguiente inserción del gen de interés en el mismo.

Para seleccionar los plásmidos que contienen el gen de interés, se realizó una digestión de la mezcla anterior con la enzima *DpnI* (Roche) durante 10 horas a 37 °C, ya que éstos no presentan secuencias metiladas y por lo tanto no van a ser digeridos por dicha enzima. Posteriormente, se llevó a cabo una segunda digestión con *NotI* (Takara) durante 4 horas a 37°C en tampón H (Takara), ya que esta diana de restricción se encuentra en la región intergénica no codificante presente sólo en el plásmido original y no en los plásmidos que han incorporado el inserto. Cuando el inserto presenta la diana de restricción *NotI* no se realizó dicha digestión. Posteriormente, ambas enzimas se inactivaron mediante una incubación a 65 °C durante 25 min y una vez inactivadas, las células competentes de *E. coli* DH10B se transformaron con el producto de la digestión (ver apartado 4 de Materiales y Métodos). Como medio de selección se utilizaron placas de LB suplementadas con ampicilina a 100 µg/mL.

3.7. Secuenciación de DNA y análisis de la información

La secuenciación de DNA se llevó a cabo en el servicio de secuenciación SECUGEN (<http://www.secugen.es>). Para ello se utilizó un secuenciador automático modelo *ABI Prism 377* (Applied Biosystems) con el kit de secuenciación *BigDye® Terminator v3.1* (Applied Biosystems) con terminadores fluorescentes y la DNA polimerasa *AmpliTaq FS* (Applied Biosystems). El programa BLAST se utilizó para la búsqueda de secuencias similares depositadas en las bases de datos de EMBL y GenBank (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>).

Los alineamientos múltiples de las secuencias se llevaron a cabo con el programa Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

3.8. Manipulación de DNA con enzimas de uso común en biología molecular

Las enzimas utilizadas fueron *DpnI* (Roche), *NotI* (Takara), *KpnI* (Healthcare-Amersham), *XbaI* (Roche) y la enzima T4 DNA ligasa (USB). Las enzimas y sus correspondientes tampones se utilizaron siguiendo las indicaciones recomendadas por cada proveedor.

3.9. Interrupción genética en *L. plantarum*

Con objeto de analizar *in vivo* la actividad de las esterasas Lp_0796 y JDM1_1092 identificadas en esta tesis, se llevó a cabo la interrupción de los genes de *L. plantarum* que las codifican mediante recombinación homóloga. Para ello, se amplificaron fragmentos internos de los genes a interrumpir mediante PCR y se clonaron en el plásmido pUCE191 (Amp^R y Em^R) (Arrecubieta, et al., 1995). El plásmido pUCE191 replica en *E. coli* pero es incapaz de replicar en *L. plantarum*. Los oligonucleótidos utilizados para amplificar los fragmentos internos de dichos genes se diseñaron incorporando las dianas de restricción *KpnI* y *XbaI* (Tabla 4). La clonación se llevó a cabo

digiriendo tanto el plásmido pUCE191 como los fragmentos internos de los genes amplificados con dichas enzimas de restricción a 37 °C durante 15 h, utilizando los tampones recomendados por el fabricante.

Los productos de la digestión se purificaron a partir de agarosa, se ligaron utilizando la enzima ligasa (USB) en el tampón adecuado a 17 °C durante 15 h y, posteriormente, las células competentes de *E. coli* DH10B se transformaron con los productos de la ligación. Debido a que el lugar de clonación múltiple en el plásmido pUCE191 se encuentra situado dentro del gen *lacZ*, aquellas células transformadas con el plásmido que incorporan el fragmento interno, presentan el gen *lacZ* interrumpido y por lo tanto carecen de actividad β -galactosidasa. Por ello, las colonias de *E. coli* transformadas se seleccionaron en placas de LB suplementadas con ampicilina (100 μ g/mL), isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) (Sigma, Alemania) (0,2 mM) utilizado como inductor del gen *lacZ* y el sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-gal) (0,04 mg/mL) que se hidroliza por la acción de la enzima LacZ dando lugar a un producto de color azul. Las colonias que se seleccionaron son las que presentaron color blanco debido a que carecen de actividad β -galactosidasa, indicativo de que habían incorporado el inserto. A partir de las células de *E. coli* transformadas se extrajeron los plásmidos recombinantes conteniendo los fragmentos internos de los genes de interés. Posteriormente, las células competentes de *L. plantarum* se transformaron con los plásmidos obtenidos (ver apartado 5 de Materiales y Métodos).

Los transformantes de *L. plantarum* presentan en su cromosoma el resultado de la recombinación homóloga entre el gen nativo cromosómico y el correspondiente fragmento interno clonado en el plásmido pUCE191, produciéndose la consiguiente interrupción génica por inserción-duplicación. Dichos transformantes se seleccionaron en placas de MRS suplementadas con eritromicina (10 μ g/mL) y lincomicina (100 μ g/mL).

Para evitar la selección de mutantes espontáneos resistentes a dichos antibióticos, se comprobó la presencia del plásmido pUCE191 en el interior de las células transformadas mediante amplificación por PCR del gen que confiere resistencia a la eritromicina, utilizando los oligonucleótidos 697 y 698 (Tabla 4). Además, se comprobó la correcta integración de los plásmidos en el interior de los genes seleccionados de *L. plantarum* mediante amplificación por PCR

utilizando un oligonucleótido complementario al plásmido (1224 o 1233) (Tabla 4) y uno externo al fragmento del gen interrumpido.

4. Transformación genética en *E. coli*

Para la transformación genética de *E. coli*, se prepararon células competentes obtenidas mediante el método de cloruro de rubidio (Hanahan, 1983). Las células competentes se consiguieron cultivando células de *E. coli* DH10B o BL21 (DE3) en 100 mL de LB hasta una DO₆₀₀ de 0,48, posteriormente se mantuvieron en hielo durante 30 min y el cultivo se centrifugó a 3800 x g durante 7 min a 4 °C. El sedimento celular se resuspendió en 30 mL de la solución TFB I (RbCl 100 mM, MnCl₂ 50 mM, KOAc 30 mM, CaCl₂ 10 mM y glicerol 15%) durante 90 min a 4 °C. Pasado ese tiempo, la suspensión celular se centrifugó a 3800 x g durante 7 min a 4 °C y el sedimento se resuspendió suavemente en 4 mL de la solución TFB II (MOPS 10 mM, RbCl 10 mM, CaCl₂ 75 mM y glicerol 15%) hasta obtener una suspensión homogénea de células competentes. La suspensión se repartió en alícuotas de 200 µL y éstas se conservaron a -80 °C.

La transformación de las células obtenidas se realizó incubándolas con el plásmido (100 ng) durante 15 min en hielo, seguido de 3 min a 37 °C y de 5 min en hielo. Posteriormente, se añadió 1 mL de LB a las células y se incubaron a 37 °C en agitación durante una hora. Terminada la incubación las células transformadas se seleccionaron en placas de LB conteniendo el antibiótico correspondiente y se incubaron a 37 °C hasta la aparición de colonias. Para la co-expresión de los genes de las esterasas con chaperonas, se llevó a cabo una cotransformación de las células competentes de *E. coli* con el plásmido que contiene el gen de esterasa clonado, el plásmido pGRO7 (Takara) y 2 µL de β-mercaptoetanol al 10%.

5. Transformación genética en *L. plantarum*

La obtención de células electrocompetentes de *L. plantarum* y la transformación de las mismas se llevó a cabo por el método descrito por

Aukrust y Blom (Aukrust y Blom, 1992). Con objeto de obtener células de *L. plantarum* electrocompetentes con la pared celular permeable, éstas se cultivaron en el medio MRS modificado (MRS*) a 30 °C durante 18 h. Este medio MRS* se diferencia del medio MRS descrito por De Man et al. (1960) por la adición del aminoácido glicina (1%) y la eliminación de la principal fuente de carbono (glucosa). En las células Gram+ esta modificación del medio provoca una alteración en la organización del péptidoglucano, debilitando la pared celular y aumentando su permeabilidad (Hammes et al., 1973). Posteriormente, con objeto de restaurar las células, se añadió glucosa (1% concentración final) al cultivo y éste se incubó hasta una DO₆₀₀ de 0.6, momento en el que se centrifugó el cultivo a 3000 x g durante 5 min a 4 °C. El sedimento celular se lavó con MgCl₂ (1 mM) y después con polietilenglicol (PEG-1500) al 30%. Finalmente el sedimento celular se resuspendió suavemente en PEG-1500 al 30% en frío, en una centésima parte del volumen del cultivo inicial.

La transformación se llevó a cabo mediante electroporación, añadiendo 4 µL de plásmido a 40 µL de células electrocompetentes de *L. plantarum*. La mezcla se pasó a cubetas de electroporación y se aplicaron los siguientes parámetros: 400 Ω, 25 µF y 1.50 kV en un equipo *Gene Pulser Xcell*TM. Las células transformadas se cultivaron en medio MRS suplementado con 0.5 M de sacarosa y 0.1 M de MgCl₂ a 30 °C sin agitación durante 2 h permitiendo así la reconstitución de la pared celular. Las células transformadas se seleccionaron en placas de MRS suplementadas con lincomicina (10 µg/mL) y eritromicina (100 µg/mL) o cloranfenicol (8 µg/mL) a 30 °C hasta la aparición de las colonias.

6. Transformación genética en *L. lactis*

Para la obtención de células electrocompetentes de *L. lactis* y la transformación de las mismas, se utilizó el método descrito por Holo & Nes (1989). Con objeto de obtener células competentes con la pared celular permeable, *L. lactis* se cultivó en medio GM17 modificado (GM17*) a 30 °C durante 18 h. Este medio GM17* contiene adicionalmente 5 g/L de glucosa, 0.5 M de sacarosa y el aminoácido glicina (1.8%). Posteriormente, el cultivo se diluyó hasta una DO₆₀₀ de 0.4 en medio fresco GM17* y se incubó hasta una

DO₆₀₀ de 0.6, momento en el que se centrifugó a 3000 x *g* durante 5 min a 4°C. El sedimento celular se lavó con una solución de sacarosa 0.5 M y glicerol al 10%, se centrifugó a 3000 x *g* durante 5 min a 4°C y posteriormente el sedimento se resuspendió en PEG-1500 al 30%, en una centésima parte del volumen del cultivo inicial.

Para llevar a cabo la transformación, se homogeneizaron 40 µL de células electrocompetentes de *L. lactis* y 3 µL de plásmido. La mezcla se pasó a cubetas de electroporación y se llevó a cabo la electroporación utilizando los parámetros: 200 Ω, 25 µF y 2.5 kV. Las células transformadas se cultivaron en medio GM17 suplementado con 5 g/L de glucosa, 0.5 M de sacarosa, 0.02 M de MgCl₂ y 0.002 M de CaCl₂ a 30 °C sin agitación durante 2 h, permitiendo así la reconstitución de la membrana celular.

Las células transformadas se seleccionaron en placas de GM17 suplementadas con cloranfenicol (5 µg/mL) a 30 °C hasta la aparición de las colonias.

7. Técnicas de proteínas

7.1. Preparación de extractos proteicos

Los extractos proteicos libres de células se obtuvieron a partir de cultivos de bacterias lácticas o de *E. coli*. Para ello, los cultivos se centrifugaron a 7000 x *g* durante 15 min a 4 °C. El sedimento se sometió a tres lavados en solución salina para eliminar restos del medio y, posteriormente, se resuspendió en tampón fosfato sódico 50 mM, pH 7.0. Esta suspensión celular se rompió mediante tres pases por una prensa de French (Amicon French pressure cell, SLM Instruments) a una presión de 1100 psi y posteriormente el lisado se centrifugó a 17400 x *g* durante 40 min para eliminar las células completas y los restos celulares. Todo el proceso se realizó a 4 °C. El sobrenadante obtenido se filtró (Millipore, 0.2 µm de tamaño de poro) y los extractos proteicos libres de células así obtenidos se utilizaron para los ensayos enzimáticos en el momento de su preparación.

Los extractos proteicos se cuantificaron mediante el método de Bradford (Bradford, 1976). Para ello se añadieron 5 µL de la muestra a analizar en 1 mL

del reactivo *Bradford Protein Assay* (Bio-Rad) diluido en agua destilada (1:4.). A continuación se agitó la mezcla y se midió en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm. La curva patrón se realizó utilizando diferentes concentraciones de la proteína seroalbúmina bovina (BSA) en las mismas condiciones.

7.2. Hiperproducción y purificación de enzimas recombinantes

Para llevar a cabo la caracterización bioquímica de las proteínas con actividad esterasa, los genes que las codifican se clonaron en los vectores de expresión de la familia pURI (Curiel et al., 2011) mediante el sistema de clonación LIC (De las Rivas et al., 2007). Estos vectores de expresión presentan promotores inducibles por IPTG y una secuencia líder que codifica una cola de afinidad de seis histidinas (His₆), con objeto de hiperproducir y purificar las proteínas recombinantes en un único paso. Además, en el vector pURI3-TEV, esta secuencia líder presenta la secuencia de reconocimiento para la proteasa TEV entre la secuencia de aminoácidos de la proteína y la cola de histidinas en el extremo N-terminal. De esta forma, se puede eliminar la cola de afinidad de la proteína recombinante una vez purificada y obtener así una proteína recombinante idéntica a la proteína salvaje.

Para la propagación e hiperexpresión de los genes insertados en los vectores de expresión pURI se utilizaron las cepas de *E. coli* DH10B y BL21 (DE3) respectivamente. En el caso de los plásmidos pURI2 recombinantes, todos los pasos desde su construcción hasta la expresión se realizaron en la cepa *E. coli* DH10B debido a la presencia del promotor-operador *lac* inducible por IPTG. Sin embargo, los vectores pURI3 recombinantes, aunque inicialmente el plásmido se propaga y amplifica en células de *E. coli* DH10B, para su expresión es necesario transformar células que contengan la RNA-polimerasa T7 del fago defectivo DE3 por lo que se utilizaron las células *E. coli* BL21 (DE3). Las células de *E. coli* transformadas con los plásmidos recombinantes se incubaron a 37 °C con agitación en medio LB con ampicilina a una concentración final de 100 µg/mL. En el caso las cepas *E. coli* BL21 (DE3) cotransformadas con el plásmido pGRO7, se adicionó cloranfenicol a 20 µg/mL y L-arabinosa (2 g/L) para la hiperexpresión de las chaperonas. Cuando

los cultivos alcanzaron una DO_{600} de 0.4-0.6, se indujo la hiperexpresión del gen añadiendo a los cultivos IPTG a una concentración final de 0.4 mM.

Posteriormente, se ensayaron distintas condiciones de inducción con IPTG valorando así las condiciones óptimas para la producción de las proteínas recombinantes en estado soluble. La inducción con IPTG se ensayó a 22 °C, 30 °C y 37 °C durante 4 h y 20 h con agitación y, de manera general, se observó que las condiciones óptimas de inducción fueron a 22 °C y 20 h. En el caso de los cultivos en medio M9 para la expresión de proteínas con selenio metionina, en el momento de la inducción con IPTG se añadió al medio una mezcla que contenía los siguientes L-aminoácidos: 25 µg/L de lisina, fenilalanina y treonina, 12.5 µg/L de isoleucina, leucina y valina con el fin de inhibir la ruta para la síntesis de metionina. Finalmente se añadieron 50 mg/L de Se-metionina (Acros organics).

Finalizado el periodo de inducción, las células se recogieron mediante centrifugación a 7000 x *g* durante 15 min a 4 °C. Las células se resuspendieron en tampón fosfato sódico 50 mM, 300 mM de NaCl, pH 7,0 y se rompieron mediante prensa de French para obtener el extracto celular conteniendo la enzima recombinante soluble. Finalmente, éste se filtró a través de un filtro de 0,2 µm de tamaño de poro (Millipore).

La proteína se purificó mediante cromatografía de afinidad de unión a metales (IMAC) utilizando la resina *TALON*® (Clontech). Para ello, el extracto celular se puso en contacto durante 20 min a temperatura ambiente con 1 mL de la resina con cobalto previamente equilibrada con tampón fosfato sódico 50 mM, 300 mM de NaCl, pH 7,0. Una vez unida la proteína a la columna, se realizó un lavado con tampón fosfato sódico 50 mM, 300 mM de NaCl, pH 7,0 conteniendo 10 mM de imidazol y posteriormente, la proteína recombinante se eluyó con 150 mM de imidazol en el mismo tampón. En algunos casos, las proteínas se eluyeron con tampón McIlvaine (citrato/fosfato) 150 mM pH 5,0 (Sumby et al., 2009).

La pureza de la enzima se determinó en geles de SDS-PAGE, lo cual permitió conocer las fracciones que contenían la proteína. Dichas fracciones se dializaron frente a tampón fosfato sódico 50 mM, 300 mM de NaCl, pH 7,0 a 4 °C utilizando membranas de diálisis (Cellu Sep) de 3,5 kDa de diámetro de poro. Se realizaron varios cambios de tampón para eliminar el imidazol

presente en la muestra.

La concentración de proteínas se determinó midiendo la absorbancia a 280 nm y utilizando el coeficiente de extinción molar calculado de cada proteína (<http://web.expasy.org/protparam/>).

7.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida

La electroforesis de proteínas se realizó en condiciones desnaturalizantes en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS). La técnica utilizada fue la descrita por Laemmli (Laemmli, 1970) utilizando geles de poliacrilamida a una concentración de acrilamida dependiente del tamaño molecular de las proteínas a analizar. Las muestras que contenían la proteína a resolver se hirvieron durante 5 min en presencia de un tampón Tris-HCl 6,5 mM pH 6,8; SDS 2%; β -mercaptoetanol 5%; glicerol 10% y azul de bromofenol 0,005%. La electroforesis se realizó a temperatura ambiente, utilizando como electrolito el tampón Tris-HCl 25 mM; glicina 192 mM; SDS 0.1%. Las proteínas presentes en los geles se tiñeron con azul brillante de Coomassie R-250 (Sigma, Alemania). Como marcador de masa molecular se empleó *SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range* (BioRad).

7.4. Identificación de proteínas mediante huella peptídica y fragmentación MALDI-TOF/TOF

Con objeto de identificar determinadas proteínas hiperproducidas de forma soluble o las que se encontraban en la fracción insoluble, se cortaron las bandas correspondientes del gel SDS-PAGE y se analizaron mediante MALDI-TOF/TOF. Dicha identificación se llevó a cabo en el Servicio de Proteómica del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB).

Brevemente, se realizó una digestión de las muestras con la proteasa tripsina y, posteriormente, ésta se analizó en el espectrómetro de masas MALDI-TOF-TOF *Autoflex III* (Bruker). El espectro de masas resultante presentó una serie de masas (m/z) que correspondían a los péptidos tripticos característicos de las proteínas presentes en la muestra. Esas masas y sus fragmentaciones se combinaron y enfrentaron a una base de datos de

proteínas (NCBI nr). Empleando el motor de búsqueda *Mascot* se compararon todas las masas tripticas teóricas de las proteínas contenidas en la base de datos frente a las masas experimentales obtenidas a partir de la muestra. El resultado fue una lista de candidatos estadísticamente validados con una determinada puntuación (*score*) para un determinado p-valor ($p < 0,05$).

7.5. Caracterización bioquímica de las enzimas esterasas

Se han descrito numerosos métodos para detectar la actividad esterasa (Beisson et al., 2000; Kuznetsova et al., 2005; Hasan et al., 2009). En esta tesis, se ha determinado la actividad estera de las enzimas mediante un método colorimétrico utilizando ésteres derivados de *p*-nitrofenilo (pNF) de distinta longitud de la cadena acilo (ver apartado 8.1 de Materiales y Métodos). La hidrólisis de estos sustratos libera *p*-nitrofenol (alcohol), que presenta color amarillo, permitiendo su cuantificación siguiendo la absorbancia a 348 nm. Una desventaja de este método colorimétrico es la sensibilidad de estos sustratos al imidazol, lo que imposibilita la utilización de proteínas eluídas directamente de las columnas de afinidad a metales (Kuznetsova et al., 2005).

Para ello, se incubó la enzima esterasa con los ésteres de pNF (1 mM) en tampón fosfato sódico 50 mM pH 7,0 (en algunos casos en tampón McIlvaine 50 mM pH 5) en un volumen final de 1 mL a 20 °C, 30 °C o 37 °C, durante 5-10 min. La reacción se detuvo introduciendo inmediatamente las muestras en hielo. La cuantificación de la actividad se determinó espectrofotométricamente siguiendo la cantidad de *p*-nitrofenol liberado a 348 nm. Paralelamente, se llevó a cabo un control de la reacción sin enzima para valorar la hidrólisis espontánea de los sustratos. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Una primera aproximación para clasificar las esterasas es determinar la especificidad de sustrato en función de su preferencia por la hidrólisis de sustratos de cadena acilo larga (C12 a C18) o sobre los de cadena acilo corta (C2-C6).

Dicha especificidad se determinó empleando los siguientes ésteres de pNF como sustratos: acetato de pNF (pNFA) (C2), butirato de pNF (o butanoato

de pNF) (pNFB) (C4), caprilato de pNF (octanoato de pNF) (pNFO) (C8), laurato de pNF (dodecanoato de pNF) (pNFL) (C12), miristato de pNF (tetradecanoato de pNF) (pNFM) (C14) y palmitato de pNF (o hexadecanoato de pNF) (pNFP) (C16) (Figura 8). Todos ellos se adquirieron en la casa comercial Sigma-Aldrich.

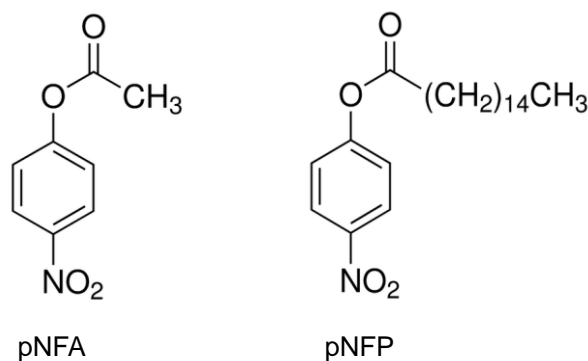


Figura 8. Estructura de algunos dos ésteres derivados de *p*-nitrofenilo, el de menor longitud de la cadena acilo, acetato de *p*-nitrofenilo (pNFA) y el de mayor longitud de cadena acilo, palmitato de *p*-nitrofenilo (pNFP).

La especificidad de sustrato se determinó además mediante el método colorimétrico descrito previamente por Liu y colaboradores (Liu et al., 2001) en el que se utiliza *p*-nitrofenol como indicador de pH para determinar la hidrólisis de los ésteres (ver apartado 8.2 de Materiales y Métodos). La actividad de las proteínas se evaluó frente a una colección general de 42 ésteres disponibles comercialmente.

La temperatura óptima de la enzima con actividad esterasa se determinó siguiendo las condiciones del ensayo colorimétrico, modificando la temperatura de reacción. La enzima se incubó con el sustrato durante 5-10 min a diferentes temperaturas entre 5 y 65 °C (5, 20, 30, 37, 40, 45, 55 y 65 °C) y se determinó la actividad residual.

Para estudiar la termoestabilidad se incubó la enzima esterasa en tampón fosfato 50 mM pH 7,0, a varias temperaturas (20, 30, 37, 45, 55 y 65 °C) durante diferentes intervalos de tiempo (desde 15 min a 20 h). Tras los periodos de incubación, se comprobó la actividad residual de las enzimas utilizando para ello el ensayo colorimétrico.

Con objeto de determinar el pH óptimo, la enzima se incubó a diferentes valores de pH (3,0-9,0), durante 5-10 min a 20-37 °C, utilizando tampón acetato sódico-ácido acético 100 mM para los pH entre 3,0 y 5,0, tampón fosfato sódico para pH 6,0, 6,5 y 7,0, tampón Tris-HCl 100 mM para pH 8,0 y finalmente tampón glicina-NaOH 100 mM para pH 9,0.

Para el estudio del efecto de metales y otros aditivos en la actividad esterasa, se prepararon disoluciones de diferentes aditivos en tampón fosfato 50 mM pH 7.0 a una concentración de 25 mM. Los aditivos utilizados fueron:, KCl, CaCl₂, HgCl₂, MgCl₂, ZnCl₂, CuCl₂, NiCl₂, MnCl₂, Tritón X-100, Tween 20, Tween 80, SDS, urea, EDTA, DMSO, cisteína, DTT, β-mercaptoetanol, PMSF y DEPC.

La proteína se preincubó durante 5 min a temperatura ambiente en tampón fosfato sódico pH 7,0 en presencia de 1 mM de los distintos aditivos. Posteriormente se añadió el sustrato y la reacción se realizó siguiendo las condiciones estándar, midiendo la actividad esterasa residual y comparándola con la muestra control sin aditivos.

7.6. Cristalización y estudio estructural

El análisis inicial de las condiciones de cristalización de las proteínas Lp_0973 y Lp_2923 de *L. plantarum* WCFS1 se llevó a cabo a una temperatura de 18 °C utilizando el método de difusión de vapor con gota colgante (Jancarik y Kim, 1991). Para ello se emplearon kits comerciales de soluciones de cristalización (Hampton Research), en placas de 96 pocillos (Innovaplate SD-2) utilizando el robot *Nanodrop Innovadyne* (IDEX Health & Science LLC). Las gotas contenían 250 nL de proteína (7-9 mg/mL) en tampón Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, NaCl 0.1 M, azida sódica al 0,04% (p/v) (esto último sólo presente en el caso de Lp_0973) y 250 nL la solución de cristalización. Las condiciones iniciales en las que se observaron cristales se sometieron a una siguiente etapa de escalado. Las condiciones finales optimizadas que permitieron la preparación de cristales de alta calidad fueron acetato sódico trihidratado 2,8 M pH 7,0, en una relación 1:1 (proteína:precipitante), con un volumen final de 2 mL para Lp_0973, y tampón malonato sódico 1 M, Jeffamine ED-2001, HEPES pH 7,0, DTT 5 mM (2:1 (proteína:precipitante)) para los cristales de Lp_0973

marcada con Se-Met. En el caso de Lp_2923 dichas condiciones fueron sulfato amónico 1,7 M y acetato sódico 0.15 M pH 4.0, en una relación 2:1 (proteína: precipitante), con un volumen final de 3 μ L.

7.6.1. Resolución estructural

Los cristales adecuados para el análisis de difracción por rayos X se sumergieron durante aproximadamente 10 segundos en una solución crioprotectora optimizada que consistió en la anterior solución de cristalización con un 20% de glicerol (v/v) (Lp_0973) o 2-metil-2,4-pentanodiol (v/v) (Lp_2923). Inmediatamente después los cristales se mantuvieron a -173 °C mediante un flujo controlado de nitrógeno líquido, regulado mediante un *Cryostream controller 700* (Oxford Cryosystems). Se llevaron a cabo experimentos de *criosoaking* con los cristales nativos así obtenidos, con una solución crioprotectora conteniendo los sustratos acetato de fenilo y acetato de isopropenilo (10 mM de concentración final). Los datos de difracción se recogieron en un detector Pilatus 6M (Area Detector Systems Corp.), en una fuente de radiación sincrotrón, concretamente, en la línea ID29 del *European Synchrotron Radiation Facility* (ESRF; Grenoble, Francia).

El procesamiento de los datos (indexado, integración y escalado) se llevó a cabo con los programas iMOSFILM, XDS y SCALA del paquete informático de CCP4 (*Collaborative Computational Project, Number 4*) (Winn, et al., 2011). La estructura de la esterasa Lp_0973 se determinó mediante difracción anómala de única longitud de onda (SAD, Single-wavelength Anomalous diffraction) utilizando AutoSol y el modelo se construyó con AutoBuild de PHENIX (Adams et al., 2010). Posteriormente, las coordenadas atómicas obtenidas (código PDB: 4c87), se utilizaron como modelo de búsqueda para refinar el modelo y la obtención del modelo definitivo (código PDB: 4c89). La estructura de la enzima Lp_2923 se llevó a cabo mediante reemplazamiento molecular con PHASER (McCoy et al., 2007) utilizando PHENIX (Vagin y Teplyakov, 1997). Como modelo, se utilizaron las coordenadas atómicas de otra forma cristalina de la enzima Lp_2923 (código PDB: 3d3n), depositadas en el *Protein Data Bank* por el *North East Structural Genomics Consortium* (NESG).

7.6.2. Ultracentrifugación analítica

Los experimentos de equilibrio de sedimentación mediante ultracentrifugación analítica se llevaron a cabo a $13300 \times g$ a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ utilizando una ultracentrífuga Beckman XL-A con un rotor An-50Ti y células de doble sector. La densidad del solvente (1.002 mg/mL) y el volumen específico parcial de la enzima esterasa de *L. plantarum* se calcularon a partir de la composición del tampón ($\text{NaCl } 0,1\text{ M}$, $\text{Tris-HCl } 20\text{ mM}$ o $\text{NaCl } 0,1\text{ M}$, acetato sódico 20 mM) y de la composición predeterminada de aminoácidos de la enzima con SEDNTERP(Laue, et al., 1992). Los datos de la velocidad de sedimentación y de los experimentos de equilibrio se analizaron utilizando SEDFIT (Schuck, 2000) y HETEROANALISIS (Cole et Lary, 2009) respectivamente.

8. Ensayos de actividad enzimática

8.1. Métodos colorimétricos para la detección de la actividad esterasa

8.1.1. Sustratos derivados de *p*-nitrofenilo

Los ensayos de actividad esterasa se llevaron a cabo mediante un método colorimétrico utilizando ésteres derivados de pNF. La hidrólisis del enlace éster produce *p*-nitrofenol (amarillo), lo que permite la cuantificación de la actividad siguiendo la absorbancia a 348 nm en un espectrofotómetro.

De manera general, para la caracterización bioquímica se utilizaron ésteres derivados de pNF de cadena corta, como acetato de pNF y butirato de pNF, ya que son más solubles en medio acuoso y, además, son los que hidrolizaron más eficazmente las esterases estudiadas. Para ello, la enzima pura ($1\text{-}50\text{ }\mu\text{g}$) se incubó con $40\text{ }\mu\text{L}$ de sustrato a 25 mM en acetonitrilo/isopropanol ($1/4\text{ v/v}$) (Glogauer et al., 2011) en tampón fosfato sódico 50 mM $\text{pH } 7.0$ (1 ml de volumen final de reacción) a la temperatura óptima ($20\text{-}37\text{ }^{\circ}\text{C}$), durante $5\text{-}10\text{ min}$. La reacción se detuvo introduciendo inmediatamente las muestras en hielo y la presencia de *p*-nitrofenol se valoró

midiendo la absorbancia a 348 nm en un espectrofotómetro (UVmini-1240 Shimadzu). Paralelamente, se llevó a cabo un control de la reacción sin enzima para valorar la hidrólisis espontánea de los sustratos. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

La cantidad de enzima utilizada en el ensayo fue distinta para cada esterasa: 1 µg (Lp_0796 y Lp_0973), 5 µg (Lp_3505), 10 µg (Lp_1002, Lp_1760, Lp_2631, Lp_2923 y JDM1_1092) y 50 µg (Lp_3561 y Lp_3562). Previamente, se realizó una curva de calibrado con *p*-nitrofenol en un intervalo de concentraciones entre 0.125 mM y 1 mM. Una unidad de actividad esterasa se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 µmol de sustrato por minuto.

La especificidad de sustrato, como se ha mencionado, se determinó utilizando ésteres derivados de pNF de distinta longitud de la cadena acilo. En este caso, las soluciones de cada éster se prepararon en acetonitrilo/isopropanol (1/4 v/v) y estos sustratos se emulsionaron a una concentración final de 0.5 mM en tampón fosfato sódico 50 mM pH 7.0, conteniendo 1.1 mg/mL de goma arábica y 4.4 mg/mL de Tritón X-100 (Brod et al., 2010). Las reacciones se llevaron a cabo en las condiciones descritas anteriormente midiendo la absorbancia a 348 nm.

8.1.2. Librería de ésteres

La especificidad de sustrato de las proteínas se evaluó, además, mediante el método colorimétrico descrito por Liu et al. (2001) en el que se utiliza un indicador de pH (*p*-nitrofenol) para determinar la hidrólisis de los ésteres. La actividad se ensayó frente a una colección general de 42 sustratos disponibles comercialmente (Sigma-Aldrich, TCI, Merck, Extrasynthese y Apin Chemicals).

En la colección se han incluido ésteres para probar la selectividad respecto al tamaño de la cadena acilo, como los ésteres de etilo (acetato de etilo, butanoato de etilo, hexanoato de etilo, octanoato de etilo y decanoato de etilo con cadena de tamaño variable y los que tienen un grupo con electrones desapareados como el trifluoroacetato de etilo, bromoacetato de etilo y la glicinato de etilo), ésteres de vinilo (acetato de vinilo, propanoato de vinilo, butanoato de vinilo, hexanoato de vinilo, octanoato de vinilo, decanoato de

vinilo, tetradecanoato de vinilo y hexadecanoato de vinilo, con cadena de tamaño variable, además de benzoato de vinilo y trimetilacetato de vinilo), o ésteres de metilo (bromoacetato de metilo e hidroxiacetato de metilo, con electrones desapareados en la cadena, y mandelato de metilo, benzoato de metilo y 4-(hidroximetil)benzoato de metilo). También se han incluido ésteres para comprobar la selectividad de las esterasas por el alcohol, como los ésteres de acetato (acetato de etilo, acetato de propilo y acetato de butilo, con cadena de longitud variable, acetato de fenilo, acetato de isopropenilo, acetato de isobutilo) y los ésteres de butirato (butanoato de etilo, butanoato de vinilo). Además, se han utilizado los triglicéridos triacetina, tributirina y trilaurina. El sustrato acetato de fenilo, se utilizó además como sustrato específico de arilesterasas, teniendo en cuenta la escasa disponibilidad de enzimas con actividad arilesterasa y la importancia de las mismas industrialmente (Wang et al., 2010). También se incluyeron compuestos utilizados por las feruloil esterasas como el ferulato de metilo, sinapinato de metilo, p-cumarato de metilo, cafeato de metilo, ácido clorogénico y ácido rosmarínico, cinamato de benzilo, sustratos de enzimas con actividad tanasa (galato de metilo y 3,4-dihidroxibenzoato de etilo) así como también fenilacetato de metilo y oleato de etilo.

El método utilizado es un método colorimétrico rápido que utiliza *p*-nitrofenol como indicador de pH para valorar la hidrólisis de los ésteres cualitativamente. Brevemente, los distintos sustratos se disolvieron en acetonitrilo (100 mM), posteriormente se preparó una solución de cada sustrato a 10 mM (acetonitrilo 10%) y se repartieron 20 μ L de sustrato, 130 μ L de tampón fosfato 1 mM pH 7,2 0.62 mM de *p*-nitrofenol y 50 μ L de la enzima pura (10 μ g) en placas multipocillo (96 pocillos, Sarstedt). De manera que la concentración final en cada pocillo es 1 mM de sustrato, 1 mM tampón fosfato sódico pH 7,2, 0,4 mM *p*-nitrofenol y 1% de acetonitrilo en un volumen final de 200 μ L. Las reacciones se llevaron a cabo incubando la placa multipocillo durante 2 h a 20-37 °C (dependiendo de la temperatura óptima de la enzima) siguiendo la disminución en la absorbancia a 410 nm (amarillo) en el lector de placas *Synergy HT BioTek microplate* (Figura 8). Los datos se recogieron durante 2 horas para asegurar que se registran tanto las reacciones que transcurren lentas como las que necesitan un periodo de latencia. Todos los

sustratos se ensayaron por triplicado y con un control de autohidrólisis sin enzima.

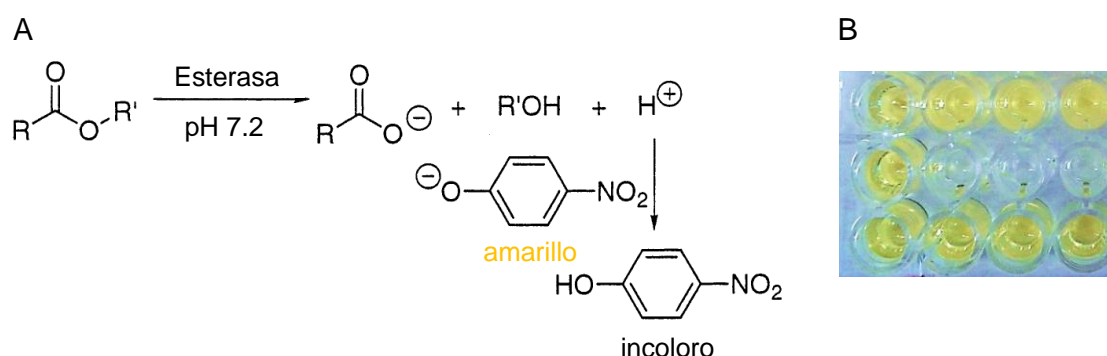


Figura 8. Análisis cualitativo de la selectividad de esterases utilizando *p*-nitrofenol como indicador de pH. A) La intensidad del color amarillo (monitorizado a 410 nm) disminuye con la hidrólisis del sustrato, debido a que el *p*-nitrofenol protonado carece de coloración. B) Ensayo en placa multipocillo con tres sustratos. Se observa en amarillo los sustratos no hidrolizados y en blanco los sustratos hidrolizados por la enzima.

8.2. Método colorimétrico para la detección de la actividad tanasa

La medida de la actividad tanasa (esterasa de ácido gálico/protocatéquico) se realizó mediante un ensayo colorimétrico para la detección de ácido gálico (Inoue & Hagerman, 1988). La rodanina es un compuesto que reacciona específicamente con el ácido gálico y no con ésteres galoilados u otros compuestos fenólicos. La rodanina en medio básico se une al ácido gálico generando 2-tioxo-4-tiazolidinona, un compuesto de color rojo con un máximo de absorción a 520 nm. Así, la actividad esterasa de la enzima tanasa de *L. plantarum* se midió mediante la cuantificación del ácido gálico formado por la hidrólisis del enlace éster del compuesto que se emplea como sustrato (galato de metilo). Para ello, la proteína purificada (10 µg) se incubó con galato de metilo 25 mM en tampón fosfato 50 mM pH 6,5, durante 5 minutos a 37 °C. Posteriormente, se añadieron 150 µL de una solución de rodanina al 0,667% en metanol y se incubó a 30 °C durante 5 minutos. Pasado este tiempo, se añadieron 100 µL de KOH 0,5 M, para que todas las muestras ensayadas presenten el mismo pH (pH 11). Este aumento de pH de la reacción

produce un cambio de color revelando la presencia de ácido gálico (púrpura) o su ausencia (amarillo). Posteriormente, se midió la absorbancia a 520 nm en el espectrofotómetro UVmini-1240 (Shimadzu). Previamente, se realizó una curva de calibrado con ácido gálico en un intervalo de concentraciones entre 0.125 mM y 1 mM. Una unidad de actividad tanasa se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μ mol de ácido gálico por minuto.

8.3. Análisis mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Para estudiar la capacidad que tienen las bacterias lácticas para transformar algunos compuestos fenólicos (galato de metilo, 3,4-dihidroxibenzoato de etilo, cafeato de metilo, ferulato de metilo, *p*-cumarato de metilo y sinapinato de metilo), éstas se cultivaron durante una semana a 30 °C sin agitación en un medio conteniendo una concentración 1 mM del compuesto fenólico a ensayar. Después de la incubación, los compuestos fenólicos presentes en el medio de cultivo se extrajeron, a partir de los sobrenadantes, mediante dos extracciones con un tercio del volumen de acetato de etilo y se analizaron mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

La actividad enzimática de proteínas puras sobre diferentes compuestos fenólicos se realizó mediante la incubación de la proteína pura a una concentración de 100 μ g/mL en tampón fosfato 50 mM a pH 7,0 a 30-37 °C, o en tampón McIlvaine 50 mM para las reacciones a pH 5,0, con el compuesto fenólico a ensayar a una concentración de 1 mM (volumen final de la reacción 1 mL). La incubación se realizó durante diferentes tiempos tras lo cual, los compuestos fenólicos presentes en la reacción se extrajeron con acetato de etilo como en el caso anterior. Como controles se utilizaron los sustratos incubados en el tampón en las mismas condiciones sin enzima.

Para el análisis por HPLC se utilizó un equipo cromatográfico *Thermo* (Thermo Electron Corporation) equipado con una bomba P4000 *Spectra System*, un inyector automático AS3000 y un detector de fotodiodos alineados UV6000LP. La muestra se inyectó en un cartucho *Nova-pack C₁₈* (25 cm x 4.0 mm d.i. x 4.6 μ m de tamaño de partícula) en fase inversa con un gradiente de fase A (agua:ácido acético, 98:2) y B (agua:acetonitrilo:ácido acético, 78:20:2)

a temperatura ambiente. El programa de elución utilizado fue el siguiente: 0-55 min, 80% B lineal, 1.1 mL/min; 55-57 min, 90% B isocrático, 1.2 mL/min; 70-80 min, 95% B lineal, 1.2 mL/min; 80-90 min, 100% lineal, 1.2 mL/min; 100-120 min, lavado a 1 mL/min. La detección de los compuestos fenólicos se realizó mediante un barrido entre 220 y 380 nm (Bartolomé et al., 2000). Las muestras se filtraron en filtros de fluoruro de polivinilideno (PVDF) 0,45 µm (Teknokroma) y se inyectaron por duplicado para su análisis.

La identificación de los productos de la degradación se llevó a cabo mediante comparación de los tiempos de retención y los espectros de absorción de cada pico con estándares comerciales.

9. Técnicas de RNA

9.1. Extracción de RNA

9.1.1. Exposición de los cultivos de *L. plantarum* a los compuestos a analizar

Las células de *L. plantarum* se activaron en MRS mediante dos pases consecutivos sin agitación a 30 °C durante 16-18 h. Para el estudio del efecto de ferulato de metilo (30 mM) y galato de metilo (30 mM) sobre la expresión génica, tanto los cultivos control como los cultivos problema se realizaron por triplicado. Las células se cultivaron en 50 mL de medio MRS empleando un inóculo del 2% a 30 °C sin agitación. Cuando el cultivo alcanzó una DO₆₀₀ entre 0,8-0,9 se adicionó el compuesto en estudio y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, los cultivos se colocaron en un baño de agua/hielo durante 7 min y se centrifugaron a 4630 g a 4 °C durante 5 min en una centrífuga *Sorvall RC 6 Plus* (Thermo Scientific).

9.1.2. Extracción y purificación del RNA

Para la extracción del RNA se siguió el protocolo de Bron et al. (2006). Después de la centrifugación del cultivo, el sedimento celular se homogeneizó en 4 volúmenes (1 mL) de tampón *Quenching* (HEPES 66,7 mM en metanol

60%, pH 6,5) en frío (-20°C). Posteriormente, la biomasa celular se separó mediante centrifugación a $11180 \times g$ durante 10 min a -10°C y se trasvasó a un vial con la mezcla de extracción conteniendo 400 μL de fenol ácido, pH 4,5, 100 μL de cloroformo, 30 μL de SDS 10%, 30 μL de acetato sódico 3M, pH 5,2, 400 μL de tampón TE y 500 mg de esferas de vidrio (425-600 micrones, SIGMA) previamente tratadas con ácido nítrico 66% durante 48 h a temperatura ambiente y lavadas con agua libre de nucleasas (agua DEPC; Sambrook et al., 1989). La suspensión celular resultante se sometió a tres ciclos de agitación en un equipo *FastPrep*TM Fp120 (SAVANT) a 5000 rpm durante 40 s. Entre cada ciclo de agitación los viales se enfriaron durante 2 min en nieve carbónica. El lisado obtenido se centrifugó a $18890 \times g$ durante 2 min a 4°C y se eliminaron los restos de proteínas del sobrenadante mediante dos extracciones sucesivas con 500 μL y 400 μL de cloroformo a 4°C . Finalmente, se recogió la fase superior acuosa, que contiene el RNA, y se congeló inmediatamente a -80°C .

9.2. Validación de las muestras de RNA

La concentración y pureza del RNA se valoró en un espectrofotómetro *Nano Drop 2000*TM (Thermo Electron Corporation). La concentración se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm. Adicionalmente, se evaluó la calidad del RNA observando la relación entre RNA y proteínas (A_{260}/A_{280}) y entre RNA y compuestos orgánicos (A_{260}/A_{230}).

La integridad del RNA se visualizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% en tampón TAE (libre de nucleasas). En el RNA, se observaron las bandas correspondientes al RNA de las subunidades 23S y 16S ribosómicas en igual intensidad. La banda correspondiente al RNA de la subunidad 5S no se observó en la mayoría de las muestras. La presencia de un mayor número de bandas o pérdida de intensidad de la banda 23S se consideró indicativo de degradación del RNA.

9.3. Tratamiento del RNA con DNasa

La presencia de trazas de DNA en el RNA purificado es habitual, siendo

imprescindible eliminarlo para evitar una alteración de los niveles de la expresión génica. El DNA se eliminó utilizando la enzima deoxirribonucleasa (DNasa), siguiendo las indicaciones de la casa comercial (Ambion). Brevemente, el RNA se incubó con 2 μ L de la enzima DNasa I a 37 °C durante 1 h, repitiendo el tratamiento hasta conseguir la eliminación del DNA. Por último, a la mezcla se añadieron 20 μ L del “reactivo de inactivación”, se incubó 2-3 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 18890 $\times g$ durante 1 min para recuperar en el sobrenadante el RNA limpio. La eliminación del DNA se comprobó mediante PCR.

9.4. Análisis de la expresión génica mediante PCR cuantitativa en tiempo real

9.4.1. Síntesis del cDNA mediante la enzima transcriptasa inversa

Para los ensayos de PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) se sintetizó el cDNA a partir del RNA puro, empleando el kit comercial *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems) siguiendo las indicaciones suministradas por el proveedor. Para ello, 1 μ g de RNA se mezcló con 1 μ L de la enzima transcriptasa inversa en un volumen final de 20 μ L conteniendo 2 μ L de oligonucleótidos cebadores universales (10X), 0,8 μ L de deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) (25X), 1 μ L de inhibidor de nucleasas y 2 μ L de tampón (10X). La reacción se llevó a cabo indistintamente en un termociclador *Mastercycler personal 5332* o en un *Mastercycler gradient 5331* (Eppendorf) a 25 °C durante 10 min seguido de 2 h a 37 °C y de un periodo de inactivación a 85 °C durante 5 s. En todos los casos se incluyó un control negativo sin RNA molde.

9.4.2. Diseño de los oligonucleótidos para el análisis mediante RT-qPCR

Los oligonucleótidos utilizados para amplificar los fragmentos internos de los genes de interés mediante PCR cuantitativa se diseñaron utilizando el programa *Primer Express 3.0* (Applied Biosystems). Las secuencias de los

genes se tomaron de la base de datos GenBank® (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>).

9.4.3. Ensayo de RT-qPCR

Los análisis de PCR cuantitativa en tiempo real se realizaron en el sistema *7500 Fast* (Applied Biosystems). Se utilizó el método que emplea como fluorocromo *SYBR Green*, que se intercala en las moléculas de DNA y permite la detección directa de los productos de PCR. Este fluorocromo presenta una longitud de onda de excitación máxima a 494 nm y una emisión máxima a 521 nm. Cada ensayo se realizó por triplicado empleando 12.5 µL de *SYBR Green real-time PCR Master Mix 2X* (Applied Biosystems) que contiene la enzima *Taq* polimerasa, MgCl₂, los dNTPs y el fluorocromo, 5 µL de cada uno de los oligonucleótidos específicos (*forward* y *reverse*) a una concentración de 200 µM y el cDNA en un volumen final de 25 µL en agua libre de nucleasas. La amplificación se inició con una activación inicial a 95 °C durante 10 min, seguida de 40 ciclos donde cada ciclo incluyó dos etapas: una a 95 °C durante 15 s (desnaturalización) y otra a 60 °C durante 1 min (hibridación/elongación). Con el fin de confirmar la ausencia de formación de dímeros por parte de los oligonucleótidos y para verificar la ausencia de DNA contaminante se incluyeron controles negativos.

El análisis por RT-qPCR en la modalidad de cuantificación absoluta se empleó para validar la eficiencia de la enzima transcriptasa inversa en la obtención del cDNA. Para ello se compararon los valores de los ciclos umbrales (Ct) (*cycle threshold*) resultantes tras realizar una RT-qPCR empleando los oligonucleótidos 597-598, que amplifican un fragmento del gen *RNAr 16S*, y utilizando como material molde para la reacción el ARN y el cDNA correspondientes a cada uno de los cultivos (tanto del grupo control sin adición del compuesto, como los de prueba). Un cDNA se consideró óptimo y se utilizó en los análisis de expresión génica mediante RT-qPCR cuando la variación $Ct_{cDNA} - Ct_{RNA}$ fue igual o superior a 10 ($\Delta Ct \geq 10$).

Paralelamente, todas las parejas de oligonucleótidos se validaron elaborando una curva patrón que utiliza los valores Ct resultantes de amplificar mediante RT-qPCR cantidades decrecientes conocidas del DNA de interés (por ejemplo: 100, 50, 25, 5, 1 y 0.25 ng/μL). Mediante el análisis de la curva “disociación-temperatura de fusión” (T_m) y realizando un análisis electroforético en geles de agarosa al 2% se verificó que en todos los ensayos tuvo lugar la amplificación de un único producto con lo cual se descarta la formación de dímeros de los oligonucleótidos. Seguidamente se obtuvieron las graficas del valor Ct vs. el \log_{10} de la concentración de DNA y se aplicó un ajuste de regresión lineal con el cálculo de los coeficientes de correlación (R^2). La ecuación de cada recta se utilizó para obtener el valor de la pendiente (que debe ser negativo e inferior a -3.15), y éste se empleó para calcular la eficiencia de la reacción (E) para cada pareja de oligonucleótidos mediante la ecuación $E = 10^{-1/\text{pendiente}}$ (Pfaffl, 2001).

Las variaciones en el nivel de transcripción de los genes endógenos se evaluaron mediante un ensayo de RT-qPCR en la modalidad de “cuantificación relativa”. La expresión de cada gen se normalizó frente al gen seleccionado como “control endógeno”. Seis genes descritos como constitutivos (genes *housekeeping*) en diversas especies de *Lactobacillus* (Marco y Kleerebezem, 2007; Duany et al., 2010; Zhao et al., 2011) y entre los que se encuentran *RNAr 16S*, *ldhD*, *gapB*, *dnaG*, *gyrA* y *rpoD* se probaron para verificar que su expresión era estable bajo las condiciones utilizadas en este estudio (Pfaffl, 2001). Se realizó el análisis de la estabilidad de los genes endógenos comparando la variación de los valores Ct utilizando la base de datos Cotton EST database RefFinder que integra los programas geNorm (Vandesompele et al., 2002), Normfinder (Andersen, et al., 2004), BestKeeper (Pfaffl et al., 2004), y el método comparativo ΔCt (Silver et al., 2006) (<http://www.leonxie.com/referencegene.php?type=reference>).

El análisis de la expresión génica se realizó mediante un estudio transcriptómico por RT-qPCR que evaluó la expresión relativa de los genes. Dicha cuantificación relativa permitió conocer cambios en la expresión de los genes a estudiar entre las muestras tratadas y las muestras control sin tratar. El valor de la expresión relativa de los genes (RQ) se determinó mediante el

método comparativo $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak y Schmittgen, 2001). El gen *RNAr 16S* se seleccionó como gen endógeno control y el cDNA del grupo control (sin adición del compuesto fenólico) se definió como calibrador (donde el nivel RQ se corrige a 1).

Aquellos genes cuyas RQ mostraron valores iguales o superiores a 1.5 veces ($FC \geq \pm 1.5$ veces) con respecto al control se consideró que presentaron una expresión diferencial con respecto al control. Para comprobar si existían diferencias estadísticamente significativas, se realizó la comparación de medias mediante una prueba *t* de Student bajo el supuesto de distribución normal para muestras de tamaño pequeño.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Metabolismo de ésteres fenólicos en *L. plantarum* WCFS1

L. plantarum es la especie de bacteria láctica que se encuentra más frecuentemente en fermentaciones de sustratos vegetales donde los ésteres de compuestos fenólicos, principalmente ésteres de ácidos hidroxicinámicos, son abundantes. Los hidroxicinamatos, como ésteres de ácido cafeico, ferúlico y *p*-cumárico se encuentran en la forma de ésteres conjugados en alimentos de origen vegetal. Actualmente, la mayoría de las enzimas implicadas en el metabolismo compuestos fenólicos en general y de ésteres fenólicos en particular permanecen desconocidas (Rodríguez, et al., 2009).

Como se ha mencionado, precisamente entre las enzimas implicadas en el metabolismo de ésteres fenólicos en *L. plantarum* se encuentran las arilesterasas (EC 3.1.1.2), que además de actuar sobre ésteres alifáticos, también presentan actividad sobre ésteres aromáticos modulando el perfil de ésteres de los alimentos. Otras esterases con un perfil de actividad sobre ésteres aromáticos más concreto son la enzima tanasa (EC 3.1.1.20) o esterasa de ácido gálico y protocatéquico y esterases con actividad feruloil esterasa (EC 3.1.1.73) capaces de hidrolizar los enlaces éster entre los ácidos hidroxicinámicos y los azúcares de las paredes celulares vegetales. En concreto, las feruloil esterases, también conocidas como esterases del ácido ferúlico, esterases de ácidos cinámicos o cinamoil esterases, son las enzimas implicadas en la liberación de compuestos fenólicos, tales como ácido ferúlico, *p*-cumárico, cafeico y sinápico de las paredes celulares vegetales (Benoit, et al., 2008).

L. plantarum es una fuente potencial de enzimas con actividad esterasa ya que se ha descrito actividad esterasa y lipolítica previamente en distintas cepas (Pérez-Martín et al., 2013; Otherlholm et al., 1967; Otherholm et al., 1968). Hasta el presente se han descrito varias esterases en *L. plantarum* (Otherholm et al., 1968; Otherholm et al., 1972; (Andersen, et al., 1995); (GOBBETTI, et al., 1996), (Gobbetti, et al., 1997), (Lopes Mde, et al., 1999), (Lopes Mde, et al., 2002); (Curiel, et al., 2009); (Jimenez, et al., 2014), entre

ellas una esterasa intracelular de los ácidos gálico y protocatéquico (tanasa). La tanasa TanB_{Lp} (previamente conocida como TanLp1) de *L. plantarum* ATCC 14917^T se caracterizó bioquímicamente y se observó que degradaba ésteres derivados de los ácidos gálico y protocatéquico (Curiel, et al., 2009). Recientemente, en algunas cepas de *L. plantarum* se ha descrito una segunda tanasa extracelular (TanA_{Lp}) y se ha caracterizado bioquímicamente (Jimenez, et al., 2014). A pesar del interés que presentan las enzimas implicadas en el metabolismo de compuestos fenólicos como las arilesterasas o feruloil esterases, capaces de hidrolizar ésteres aromáticos como los hidroxycinamatos, actualmente no se han descrito enzimas que presenten estas actividades en *L. plantarum*.

Sin embargo, enzimas con actividad feruloil esterasa o arilestera se han descrito en cepas de especies de bacterias lácticas aisladas de alimentos o de la microbiota intestinal humana, como algunas cepas de *Lactobacillus gasseri* (Couteau, et al., 2001), *Lactobacillus acidophilus* (Wang, et al., 2004), *Lactobacillus helveticus* (Guglielmetti, et al., 2008) (Fenster, et al., 2000), *Lactobacillus johnsonii* (Lai, et al., 2009); (Bel-Rhliid, et al., 2009); (Bel-Rhliid, et al., 2012) y *Lactobacillus casei* (Fenster, et al., 2003).

Teniendo en cuenta que las enzimas con actividad arilestera y feruloil esterasa constituyen un grupo interesante de enzimas, así como los microorganismos que la producen y que *L. plantarum* se encuentra en sustratos vegetales ricos en ésteres fenólicos, es probable que la cepa *L. plantarum* WCFS1, cuyo genoma se ha secuenciado completamente, codifique enzimas con actividad feruloil esterasa o arilestera.

1.1. Metabolismo de ésteres fenólicos en *L. plantarum* WCFS1

1.1.1. Degradación de ésteres fenólicos en cultivos

Con objeto de estudiar si *L. plantarum* WCFS1 posee enzimas con actividad arilestera y feruloil esterasa, se estudió la capacidad de hidrolizar ésteres fenólicos en cultivos.

Para ello, se cultivó la cepa en un medio basal modificado (RPM) en presencia de los cuatro sustratos modelo para feruloil esterasas (ferulato de metilo, cafeato de metilo, *p*-cumarato de metilo y sinapinato de metilo) (Figura 10) (1 mM) durante 7 días a 30 °C. Como control de la autodegradación de los sustratos, éstos se incubaron también a una concentración final de 1 mM en medio RPM a 30 °C durante 7 días. Pasado el periodo de incubación, los compuestos fenólicos se extrajeron y analizaron mediante HPLC. En aquellos casos en los que las células de *L. plantarum* WCFS1 son capaces de hidrolizar los ésteres ensayados, se detectan los productos finales en el medio de cultivo.

Como se observa en la Figura 10, los cultivos de *L. plantarum* WCFS1 fueron incapaces de hidrolizar los sustratos modelo de feruloil esterasas probados, ya que en el medio de cultivo no se detectaron los productos finales de la degradación. Estos resultados indican que *L. plantarum* WCFS1 carece de actividad feruloil esterasa extracelular.

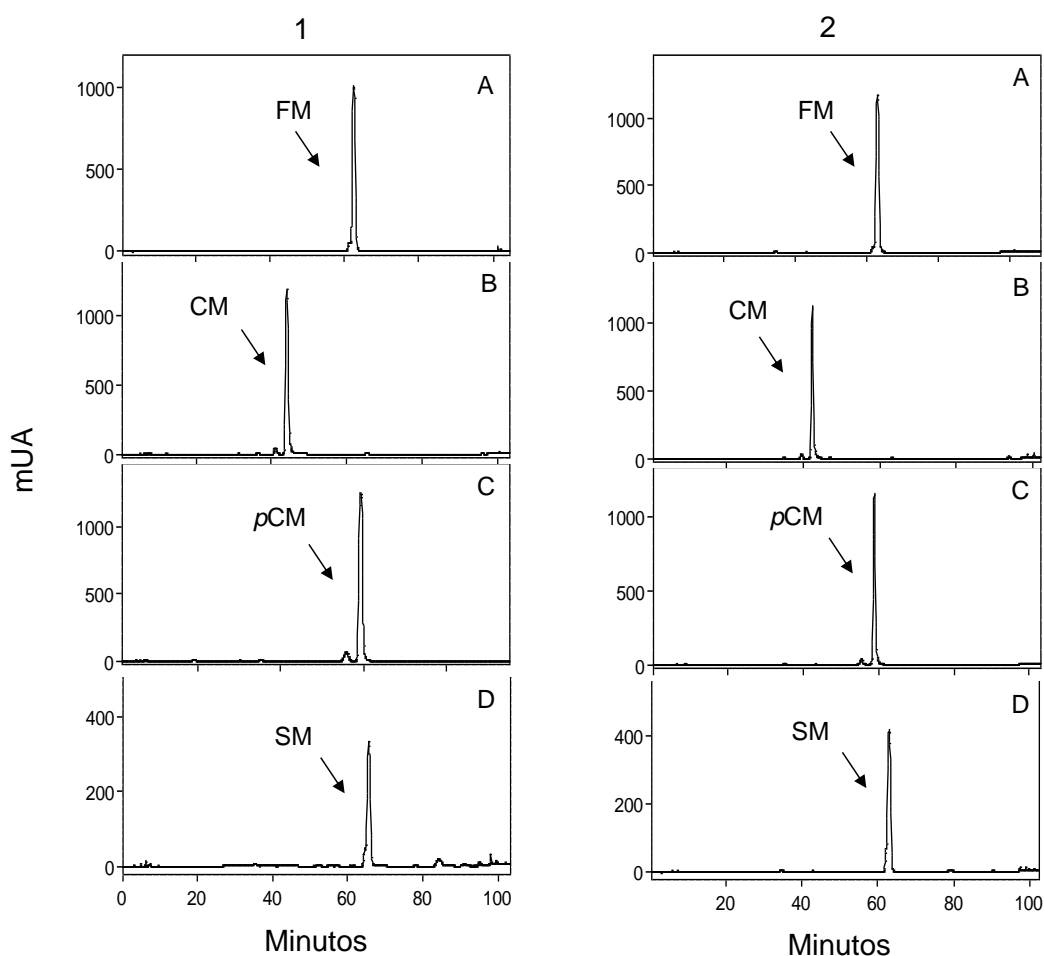


Figura 10. Análisis de la hidrólisis de ésteres de ácidos hidroxicinámicos por cultivos de *L. plantarum* WCFS1 mediante HPLC. (1) Controles incubados en medio RPM en presencia de 1 mM de ferulato de metilo (A), cafeato de metilo (B), *p*-cumarato de metilo (C) y sinapinato de metilo (D) a 30 °C durante 7 días. (2) Cultivos de *L. plantarum* WCFS1 en el medio RPM en presencia de 1 mM de ferulato de metilo (A), cafeato de metilo (B), *p*-cumarato de metilo (C) y sinapinato de metilo (D) a 30 °C durante 7 días. Se indica la presencia de ferulato de metilo (FM), cafeato de metilo (CM), *p*-cumarato de metilo (pCM) y sinapinato de metilo (SM). UA, (unidad de absorbancia). Los cromatogramas se obtuvieron a 280 nm.

1.1.2. Degradación de ésteres fenólicos en extractos libres de células

Los resultados anteriores sugieren que *L. plantarum* WCFS1 no dispone de enzimas con actividad arilesterasa/feruloilesterasa capaces de hidrolizar los sustratos ensayados. Sin embargo, a pesar de que estos ésteres fenólicos no son compuestos estructuralmente complejos, pueden no ser capaces de entrar al interior de la célula para su degradación por no disponer *L. plantarum* de un mecanismo eficaz de transporte hacia el interior celular.

Para conocer si *L. plantarum* WCFS1 posee proteínas capaces de hidrolizar ésteres de ácidos fenólicos, se analizó la actividad esterasa en extractos proteicos libres de células en presencia de ferulato de metilo, cafeato de metilo, *p*-cumarato de metilo y sinapinato de metilo. En este caso, extractos celulares procedentes de cultivos de *L. plantarum* WCFS1 inducidos durante 3 horas con 3 mM de ferulato de metilo (inductor de feruloil esterases) o sin inducir se incubaron en presencia de 1 mM de cada uno de los sustratos modelo. La incubación se llevó a cabo durante 16 horas a 30 °C. Como control y al encontrarse las proteínas del extracto disueltas en tampón fosfato 50 mM pH 7, los sustratos se incubaron en dicho tampón en las mismas condiciones.

La Figura 11 muestra que los extractos celulares de *L. plantarum* WCFS1 son capaces de hidrolizar parcialmente ferulato de metilo y *p*-cumarato de metilo. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre la hidrólisis de los extractos inducidos o no con ferulato de metilo, lo que indica que la actividad feruloil esterasa implicada no es inducible por la presencia de ferulato de metilo en el medio de cultivo bajo las condiciones experimentales ensayadas.

Estos resultados indican que *L. plantarum* WCFS1 presenta actividad feruloil esterasa intracelular, siendo la primera vez que se describe dicha actividad en *L. plantarum*. Probablemente, los cultivos de *L. plantarum* WCFS1

fueron incapaces de hidrolizar ninguno de los sustratos modelo de feruloil esterases probados debido a la ausencia de un sistema de transporte eficaz al interior de la célula, ya que extractos proteicos libres de células de esta cepa hidrolizaron parcialmente ferulato de metilo y *p*-cumarato de metilo. Sin embargo, no se puede excluir la posibilidad de que otros sustratos naturales o sintéticos si puedan entrar en la célula y ser hidrolizados por células de *L. plantarum* WCFS1.

Se ha descrito que células de *L. johnsonii* NCC 533 hidrolizan ácido rosmarínico, sin embargo no se observó actividad feruloil esterasa en el cultivo. Por otro lado, extractos celulares de *L. johnsonii* mostraron un fuerte incremento en el ratio de la reacción respecto a las células no lisadas, lo que sugiere que la enzima implicada es presumiblemente intracelular (Bel-Rhliid, et al., 2012).

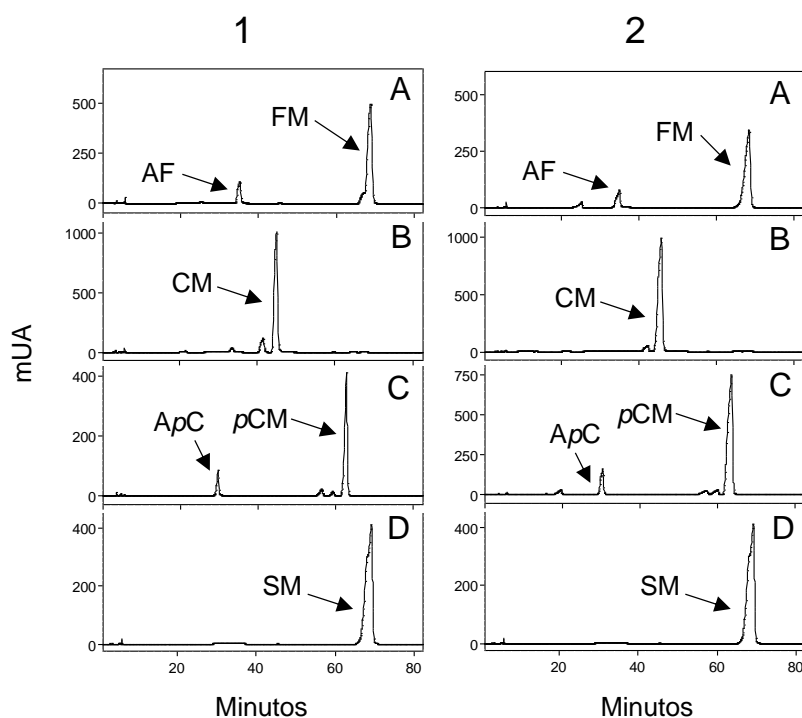


Figura 11. Análisis de la hidrólisis de ésteres de ácidos hidroxicinámicos por extractos celulares de *L. plantarum* WCFS1 mediante HPLC. Extractos de cultivos no inducidos (1) de *L. plantarum* WCFS1 o inducidos (2) con 3 mM de ferulato de metilo en presencia de 1 mM de ferulato de metilo (A), cafeato de metilo (B), *p*-cumarato de metilo (C) y sinapinato de metilo (D) a 30 °C durante 16 h. Se indica la presencia de ferulato de metilo (FM), ácido ferúlico (AF), cafeato de metilo (CM), *p*-cumarato de metilo (pCM), ácido *p*-cumárico (ApC). UA, unidad de absorbancia. Los cromatogramas se obtuvieron a 280 nm.

1.2. Identificación *in silico* de esterasas en el genoma de *L. plantarum* WCFS1

Una vez conocida la capacidad de *L. plantarum* WCFS1 para degradar parcialmente ésteres de ácidos hidroxicinámicos, se planteó identificar la proteína o las proteínas responsables de la actividad arilesterasa y feruloil esterasa sobre ferulato y *p*-cumarato de metilo en *L. plantarum* WCFS1. Para ello, se realizó un análisis *in silico* del genoma secuenciado de dicha cepa (Kleerebezem, et al., 2003). *L. plantarum* WCFS1 presenta un total de 3063 proteínas, entre las cuales no se encuentra ninguna proteína anotada como “arilesterasa”, “feruloil esterasa” o “cinamoil esterasa”. Sin embargo, *L. plantarum* WCFS1 presenta 37 proteínas anotadas como “esterasa”, de las cuales eliminando proteínas multifuncionales y aquellas que no eran intracelulares, ya que la actividad feruloil esterasa observada era intracelular, se seleccionaron 14 proteínas (Tabla 5). Tal y como refleja la Tabla 5, las 14 proteínas seleccionadas están anotadas como esterasas y lipasas o proteínas con actividades similares (acetilesterasa, carboxilesterasa y fosfodiesterasa).

La mayoría de las proteínas presentes en las bases de datos se anotan en base a su grado de homología con otras proteínas. Los métodos de anotación utilizados conducen a la propagación de errores cuando una anotación errónea se aplica de un genoma a otro (Vieites et al., 2009). Por ello, está generalmente admitido que las bases de datos contienen anotaciones erróneas en las familias de enzimas que catalizan diferentes reacciones, como el caso de las hidrolasas de ésteres carboxílicos (esterasas).

Tabla 5. Proteínas anotadas como posibles esterasas intracelulares en el genoma de la cepa *L. plantarum* WCFS1

Proteína	Anotada como	Localización	aa/kDa	pI
Lp_0796	Carboxilesterasa	Intracelular	249/27,9	5,6
Lp_0973	Esterasa	Intracelular	338/36,8	4,7
Lp_1002	Lipasa/Esterasa	Intracelular	264/28,7	5,7
	Glicerofosfodiester		228/26,0	5,5
Lp_1328	fosfodiesterasa	Intracelular		
	Glicerofosfodiester		244/28,0	7,9
Lp_1578	fosfodiesterasa	Intracelular		
Lp_1760	Lipasa/Esterasa	Intracelular	250/28,8	8,0
Lp_2631	Lipasa/Esterasa	Intracelular	261/28,4	6,1
Lp_2923	Lipasa/Esterasa	Intracelular	276/30,4	6,3
Lp_2953	Esterasa	Intracelular	249/27,0	5,8
Lp_2960	Lipasa/Esterasa	Intracelular	233/25,5	8,9
Lp_3323	Lipasa/Esterasa	Intracelular	213/23,1	5,1
Lp_3505	Acetilesterasa	Intracelular	263/30,1	6,1
Lp_3561	Lipasa/Esterasa	Intracelular	278/31,5	5,5
Lp_3562	Lipasa/Esterasa	Intracelular	278/30,9	5,2

Además, se ha descrito la dificultad para distinguir con precisión en base a la comparación de secuencias los distintos tipos de esterasas en general y de feruloil esterasas o arilesterasas en particular (Bornscheuer, 2002). Todo ello hace necesario un estudio bioquímico exhaustivo de las proteínas anotadas como esterasas/lipasas en el genoma de *L. plantarum* WCFS1 para conocer su actividad bioquímica real y para el descubrimiento de nuevas arilesterasas o feruloil esterasas {Wang, 2010 #83}.

De las 14 proteínas que aparecen en la Tabla 5, en el estudio se han incluido las proteínas Lp_0796, Lp_0973, Lp_1002, Lp_1760, Lp_2631, Lp_2923, Lp_2953, Lp_3561 y Lp_3562 anotadas como carboxilesterasas o esterasas/lipasas, las proteínas Lp_1328 y Lp_1578 con similitud con fosfodiesterasas, y la proteína Lp_3505 anotada como acetilesterasa. La proteína Lp_2953 se encuentra próxima a una tanasa intracelular (Lp_2956) caracterizada bioquímicamente (Curiel, et al., 2009). De esta forma quedan representadas la mayoría de proteínas anotadas como “esterasas” en el genoma de *L. plantarum* WCFS1. Como se ha mencionado, todas ellas

presentan una localización intracelular, determinada mediante el programa Locate-p (<http://cmbi.ru.nl/locatep-db>), ya que la actividad feruloil esterasa se detectó en los extractos celulares. También se comprobó la ausencia de un péptido señal en la secuencia de las proteínas utilizando el programa SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>).

Este trabajo supone un estudio amplio de las enzimas de *L. plantarum* WCFS1 con capacidad para sintetizar e hidrolizar ésteres. Los genes que codifican estas enzimas se clonaron, expresaron heterológamente y las proteínas esterasas de *L. plantarum* correspondientes se purificaron y caracterizaron bioquímicamente. Todo ello con objeto de identificar enzimas implicadas en el metabolismo de ésteres fenólicos.

1.3. Producción e identificación de sustratos de esterasas de *L. plantarum* WCFS1

Una vez identificadas las proteínas anotadas como esterasas en el genoma de *L. plantarum* WCFS1, en esta tesis se han hiperproducido y estudiado la actividad sobre un rango de sustratos con el fin de identificar aquellas esterasas implicadas en el metabolismo de ésteres aromáticos.

Con todas las proteínas se realizó un abordaje similar. Los genes que codifican las posibles esterasas se amplificaron mediante PCR y se clonaron en los vectores de expresión pURI3 (pURI3-TEV o pURI3-Cter) (Curiel et al., 2011). Estos vectores añaden una cola N- o C-terminal de 6 residuos de histidina en la proteína recombinante producida, lo que permite su purificación en un único paso cromatográfico. Una vez obtenidas las proteínas recombinantes puras, se caracterizó su especificidad de sustrato.

Se ha descrito que el rendimiento en la producción de proteínas recombinantes solubles depende en gran medida de la proteína en cuestión que además, puede variar significativamente en función del vector utilizado. Por ello, en el laboratorio se dispone de una familia de vectores de expresión para la hiperproducción y purificación de proteínas recombinantes solubles (Curiel et al., 2011). A pesar de que los vectores pURI se han utilizado con éxito para la

producción de proteínas de *L. plantarum*, no es habitual producir una versión soluble de cualquier proteína en el primer intento (Structural genomics consortium et al., 2008). Una estrategia para mejorar la producción de proteínas es cambiar las condiciones de expresión. En un primer paso se cambia la temperatura de inducción, aunque generalmente se recomienda utilizar temperaturas bajas (Structural genomics consortium et al., 2008). Por ello, en todos los casos se realizaron ensayos de expresión a 22 °C, 30 °C y 37 °C durante 4 h y 20 h tras la inducción con IPTG. También se recomienda probar distintos medios de cultivo para obtener buenos niveles de expresión. En los casos en que no se observó hiperproducción de la proteína en el medio LB, se ensayó también el medio mínimo M9 (Sambrook, 1989). En los casos en que la proteína no se hiperprodujo en ninguna de las condiciones ensayadas, o se producía insoluble en forma de cuerpos de inclusión, se co-produjeron con chaperonas. Se ha descrito que la hiperproducción de proteínas recombinantes en las células hospedadoras a menudo da lugar a un mal plegamiento y a la agregación de la proteína (de Marco et al., 2007). Estos problemas se pueden deber a las limitaciones en la capacidad de chaperonas de la célula hospedadora. Por ello, la coexpresión de moléculas chaperonas, mediante la cotransformación con plásmidos que expresan distintos sistemas de chaperonas con efectos sinérgicos, como el vector pGRO7 (TaKaRa), que expresa el sistema de chaperonas GroEL/GroES puede dar lugar a la producción de proteínas solubles plegadas correctamente (de Marco et al., 2007; Structural genomics consortium et al., 2008).

De este modo, de las 14 proteínas seleccionadas y anotadas como posibles esterasas, se han conseguido hiperproducir eficazmente las proteínas Lp_0796, Lp_0973, Lp_1002, Lp_1760, Lp_2631, Lp_2923, Lp_3505, Lp_3561 y Lp_3562. Pese a los diversos intentos realizados, las proteínas Lp_1328, Lp_1578 y Lp_2953 no se consiguieron hiperproducir de forma soluble. La proteína Lp_1328 se produjo insoluble en cuerpos de inclusión y no se consiguió producir de forma soluble ni al cambiar el vector de expresión o las condiciones de expresión, así como tampoco en presencia de chaperonas. La proteína Lp_1578 no se hiperprodujo eficazmente en ninguna de las condiciones ensayadas. La proteína Lp_2953 se hiperprodujo insoluble formando cuerpos de inclusión y no se consiguió solubilizar empleando las

condiciones anteriormente citadas. Esta proteína tenía un interés especial al encontrarse localizada en el genoma de *L. plantarum* WCFS1 muy próxima a la proteína TanB_{Lp} (Lp_2956), implicada en la hidrólisis de compuestos fenólicos. Por eso, además se intentó producir con codones optimizados para *E. coli*, pero aun así permanecía en cuerpos de inclusión. La presencia de estas proteínas en cuerpos de inclusión se confirmó mediante un análisis MALDI-TOF/TOF.

1.3.1. Lp_0796

Se ha descrito la existencia de una elevada diversidad estructural entre distintas feruloil esterasas (Navarro-González et al., 2013), por lo que no es posible predecir la función bioquímica de las esterasas coficadas por las ORF de *L. plantarum* WCFS1 anotadas como “esterasas”. Para profundizar en el conocimiento de esterasas en *L. plantarum*, es necesario identificar los genes y caracterizar la actividad bioquímica de las proteínas producidas. La primera proteína anotada como esterasa en el genoma de *L. plantarum* WCFS1 es Lp_0796 de 249 aminoácidos y un peso molecular estimado de 27.9 kDA, que presenta algunos motivos conservados con la familia de proteínas α/β hidrolasas (Figura 12).

La proteína Lp_0796 de *L. plantarum* WCFS1 presentó un alto grado de identidad con otras proteínas de bacterias lácticas, como la proteína CCC16385.1 de *Lactobacillus pentosus* IG1 (89%), YP_794842.1 de *Lactobacillus brevis* ATCC 367 (52%), YP_806215 de *Lactobacillus casei* ATCC 334 (46%) y WP_003554533.1 de *Lactobacillus hilgardii* (43%).

LCA	MIFREPQPFYEYEGTDTGVVLLHAYTGSPNDMFMGRALQRAGYGVYAPLFTGHGTIEPMD	60
LHI	-MQAPNKSFYFEHGPKAIIIMHAFASGPVDVRLARRLERSNYSIYAPLLTGHGTPDFKD	59
LBR	-MIRKPTPLFFEQGPQAVILLHAYSGSSNDMRLRLARLQSENITVLAPIFSGHATGDPAD	59
LPL	MMLKQPEPFFFEHGHAVILLHAYAGSANDVRMLARALEREDYTVYGPQFSGHATDDPRD	60
LPE	MMLKQPEPFYFEHGERAVILLHAYAGSANDVRMLGRTLERSDYTVYGPQFSGHATNDPRD	60
	: : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : *	
LCA	ILTKGNPDIWWAEASAAVSHMTA-KYDRVFVFGLSLGGIFAMKALEILPGVTAGGVFSSP	119
LHI	IILQGSPEIWLEDTQQAIQFMKHQGFEDISIFGLSLGGIFSARALELHPVLGGGSFGSP	119
LBR	ILRQGSPPQWWQDTQTAIANLRQRGYQQIAIFGLSLGGIFATRALMADPELQGGGTIASP	119
LPL	ILAQ-TPAQWWQDTQQAISFMRQKGYTKISIFGLSLGGIFATAALERDPQLLGGGTFFSP	119
LPE	ILAQ-TPDQWWQDTQQAISFLRQKGYTKISIFGLSLGGIFATAALERDPQLLGGGTFFSP	119
	* : : . * * : : . * : : : : : * : : * : : * : : * : : *	
LCA	ILPGKHHLPVPGFLK-YAQY-MNRLAGVPDESTQILAYLP---GQLAAIDNFTAG-VAAD	172
LHI	IVRKRRQFSVHNTFMQMARANYLRYKTDPKVMADKLQWLDEHIDDLKRISDFSAV-VASD	178
LBR	VIFRGQTNVPATFMQMAQADYQSQGLSVDEQTKRLAWLKEQLPAQLTAIQAFADT-TATH	178
LPL	LFAGNRSDVAEMFITLSHHQLAHSQFSIAEREQILMTLPELVQRQLQAVNTFTTEVTSH	179
LPE	LFAGNRSDVAEMFITLSHHQLAHSQFSLAEREQILAVLPELVQQQLQAVNTFTTEQEVTTK	179
	: . : * : : : : . * * * : . * : : . . .	
LCA	LYLVNKPFIQAGADELVGQLAYQLRDALINAPQVDFHWYDNAKHVITVNSAHHALQQ	232
LHI	LPKIHQPYFIFGQGMSEIVNPESQLVRDQLVNS-KVSYHEYPNASHMITVNSAHQQLLEI	237
LBR	LERVKQPVFIAQGDADQ MIDPRSGQWLADAYPSE-QIDFHEYAGAGHVLTVNAAHHVLET	237
LPL	LSAVTQPFIFGQGGQDELIDATVARQLRDQLPQV-PVDFHWYADAGHVITVNSAHHQLEQ	238
LPE	LTNVTQPFIFGQGGQDELIDPNVARRLQAALTQV-PVDFHWYADAGHVITVNNAAHHQLEQ	238
	* : : * * . * . * : : : . : . : : * * * * : : * * * : : *	
LCA	DVIAFMQQENEG---	244
LHI	DLSNFLTKIYE----	248
LBR	DILAFLQTIFKNNEE	252
LPL	DVLTYLTKTIYK----	249
LPE	DVLTYLKSIIYK----	249
	* : : : :	

Figura 12. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la proteína Lp_0796 de *L. plantarum* WCFS1 (LPL) (YP_004888771.1), CCC16385.1 de *L. pentosus* IG1 (LPE), YP_794842.1 de *L. brevis* ATCC 367 (LBR), YP_806215 de *L. casei* ATCC 334 (LCA) y WP_003554533.1 de *L. hilgardii* (LHI). Identidad entre aminoácidos (*), residuos conservados (:) y residuos semiconservados (.). Los guiones representan espacios introducidos para maximizar las similitudes. Se señalan los motivos conservados de la familia α/β hidrolasa: en azul el motivo que contiene la serina del centro activo, la histidina en rosa y el aspártico en verde.

La proteína Lp_0796 de *L. plantarum* WCFS1 presentó un alto grado de identidad con otras proteínas de bacterias lácticas, como la proteína CCC16385.1 de *Lactobacillus pentosus* IG1 (89%), YP_794842.1 de *Lactobacillus brevis* ATCC 367 (52%), YP_806215 de *Lactobacillus casei* ATCC 334 (46%) y WP_003554533.1 de *Lactobacillus hilgardii* (43%).

Durante la realización de esta tesis, Navarro-González y colaboradores en el año 2013 describieron la purificación y caracterización bioquímica de la

proteína Lp_0796 de *L. plantarum* WCFS1 (Navarro-González et al., 2013). Estos autores observaron que Lp_0796 es una esterasa con preferencia sobre sustratos de cadena corta como acetato y butirato de *p*-nitrofenilo, pero no estudiaron su actividad sobre ésteres aromáticos (Navarro-González et al., 2013). Con objeto de analizar la actividad de la esterasa Lp_0796 sobre ésteres aromáticos, en este trabajo se decidió hiperproducir y purificar la proteína Lp_0796 recombinante y realizar una caracterización de los posibles sustratos de la misma. Para ello, el gen *lp_0796* de la cepa *L. plantarum* WCFS1 se clonó en el vector de expresión pURI3-TEV utilizando los oligonucleótidos 703 y 704 (Tabla Materiales y Métodos) que amplificaron un fragmento de 750 pb. Estos oligonucleótidos, presentan en sus extremos 5' nucleótidos capaces de hibridar con el vector de expresión pURI3-TEV, permitiendo una clonación independiente de ligación (Curiel et al., 2011). El plásmido recombinante pURI3-TEV-0796 se propagó en la cepa de *E. coli* DH10B y una vez verificada su secuencia, se transfirió a la cepa *E. coli* BL21 (DE3) para la hiperproducción de la proteína.

La proteína esterasa recombinante se purificó en un único paso, mediante una cromatografía de afinidad a cobalto debido a la presencia de una cola de seis histidinas en su extremo N-terminal. La cromatografía de afinidad mediante metales inmovilizados permite una adsorción muy selectiva de la enzima recombinante (Armisen et al., 1999). La proteína se eluyó de la columna con imidazol (150 mM) y posteriormente se dializó para eliminar los restos del mismo, ya que puede interferir en los ensayos de actividad enzimática.

Una vez purificada y dializada la enzima Lp_0796, se realizó una electroforesis en geles SDS-PAGE al 12.5% de acrilamida para comprobar la hiperproducción de la enzima recombinante en los transformantes de *E. coli*. En la Figura 13 se puede comprobar que, tanto en el extracto soluble procedente de las células de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con el plásmido pURI3-TEV-0796 como en las diferentes fracciones eluídas de la columna de afinidad con imidazol, aparece la proteína Lp_0796 recombinante con un tamaño aproximado de 29 kDa. Como resultado de la purificación se obtuvieron 13 mg de proteína pura por litro de cultivo.

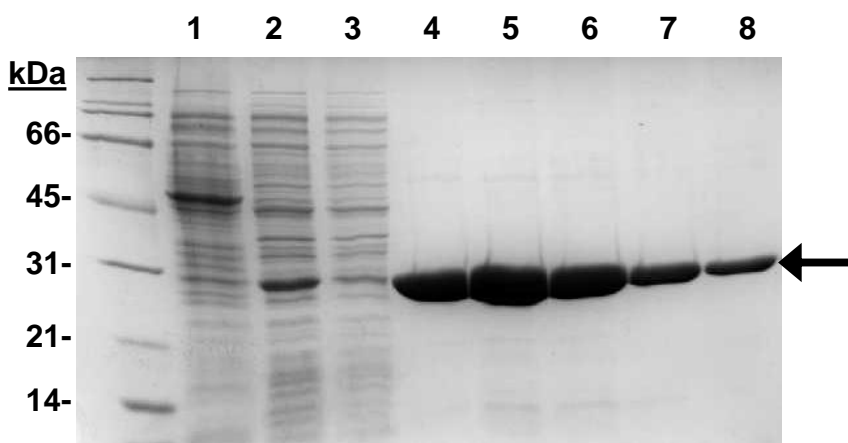


Figura 13. Hiperproducción y purificación de la proteína Lp_0796 recombinante de *L. plantarum* WCFS1. 1, extracto proteico soluble procedente de células inducidas con IPTG *E. coli* BL21 (DE3) (pURI3-TEV); 2, extracto proteico soluble de células *E. coli* BL21 (DE3) (pURI3-TEV-0796); 3, fracción eluída no retenida en la resina de afinidad; 4-8 fracciones eluídas de la columna de afinidad con imidazol (150 mM). Gel SDS-PAGE 12,5% de acrilamida. El marcador de peso molecular *Broad-Range* (Bio-Rad), está representado a la izquierda.

Una vez purificada la enzima Lp_0796 de *L. plantarum* WCFS1 se determinó su especificidad de sustrato mediante un método colorimétrico utilizando ésteres derivados de *p*-nitrofenilo, con una longitud de la cadena acilo variable. Éste es uno de los métodos más utilizados para realizar una primera clasificación de las esterasas, en función de su preferencia por la hidrólisis de sustratos de cadena corta (C2 a C6) como las verdaderas esterasas o arilesterasas, o sobre los de cadena larga (C12 a C18) como las lipasas {Wang, 2010 #83}.

La esterasa Lp_0796 presentó la máxima actividad frente a ésteres de cadena acilo corta, acetato de *p*-nitrofenilo y butirato de *p*-nitrofenilo (Figura 14A), aunque también se observó actividad sobre caprilato de *p*-nitrofenilo (C₈) y palmitato de *p*-nitrofenilo (C₁₆). Una especificidad de sustrato similar se ha descrito en otras esterasas de bacterias lácticas, como la esterasa intracelular EstB28 de *O. oeni* (Sumbly, et al., 2009), la esterasa EstCOo8 y EstC34 de *O. oeni* y *L. hilgardii* respectivamente {Sumbly, 2013 #90} y en una arilestera de *L. helveticus* (Fenster et al., 2000).

Por lo tanto, Lp_0796 es una esterasa con preferencia por sustratos de cadena acilo corta, pero para conocer si es capaz de hidrolizar otros ésteres,

se ensayó su actividad frente a una librería de 42 ésteres disponibles comercialmente {Liu, 2001 #127}. Los ésteres de la librería se eligieron para identificar la preferencia de las esterasas por un amplio rango de ésteres aromáticos. El sustrato acetato de fenilo, que es el compuesto utilizado generalmente para identificar arilesterasas {Wang, 2010 #83} se incluyó en el estudio. También se utilizaron sustratos para identificar feruloil esterasas, como ferulato de metilo, cafeato de metilo, *p*-cumarato de metilo y sinapinato de metilo, entre otros, así como sustratos específicos de tanasas como ésteres del ácido gálico. Además, se han incluido varios grupos de ésteres alifáticos para identificar la preferencia de la esterasa respecto a la longitud de la cadena acilo o al grupo alcohol y por su capacidad para hidrolizar sustratos cargados {Liu, 2001 #127}. Esto supone uno de los estudios más completos que se han realizado en esterasas de bacterias lácticas para evaluar su actividad en función del rango de sustratos que hidrolizan.

De los ésteres ensayados, Lp_0796 presentó una mayor actividad hidrolítica sobre acetato de fenilo, seguido de fenilacetato de metilo y bromoacetato de etilo y de metilo (Figura 14B). Por otra parte, Lp_0796 hidrolizó eficazmente los sustratos modelo de feruloil esterasas (cafeato de metilo, *p*-cumarato de metilo, ferulato de metilo y sinapinato de metilo). También hidrolizó otros sustratos aunque menos eficazmente, como mandelato de metilo, propanoato de vinilo, benzoato de vinilo y metilo, butanoato de vinilo, acetato de butilo y acetato de isopropenilo entre otros.

Por lo tanto, teniendo en cuenta que Lp_0796 hidrolizó los ésteres de ácidos hidroxicinámicos, se puede concluir que Lp_0796 es una feruloil esterasa, siendo la primera vez que se describe una proteína con dicha actividad en *L. plantarum*. Sin embargo, si se han descrito proteínas feruloil esterasas en *L. acidophilus* (Wang, et al., 2004) y *L. johnsonii* (Lai, et al., 2009). Considerando el perfil de actividad observado, se puede concluir que Lp_0796 presenta un espectro de sustratos relativamente amplio, no descrito previamente en otras esterasas de bacterias lácticas. Lp_0796 no hidrolizó el ácido clorogénico, un conjugado del ácido cafeico ampliamente distribuido en frutas y vegetales, sin embargo, la feruloil esterasa descrita en *L. acidophilus* si hidrolizó ácido clorogénico (Wang, et al., 2004). Las feruloil esterasas de *L.*

johnsonii presentaron además actividad frente a ácido rosmarínico (Lai, et al., 2009).

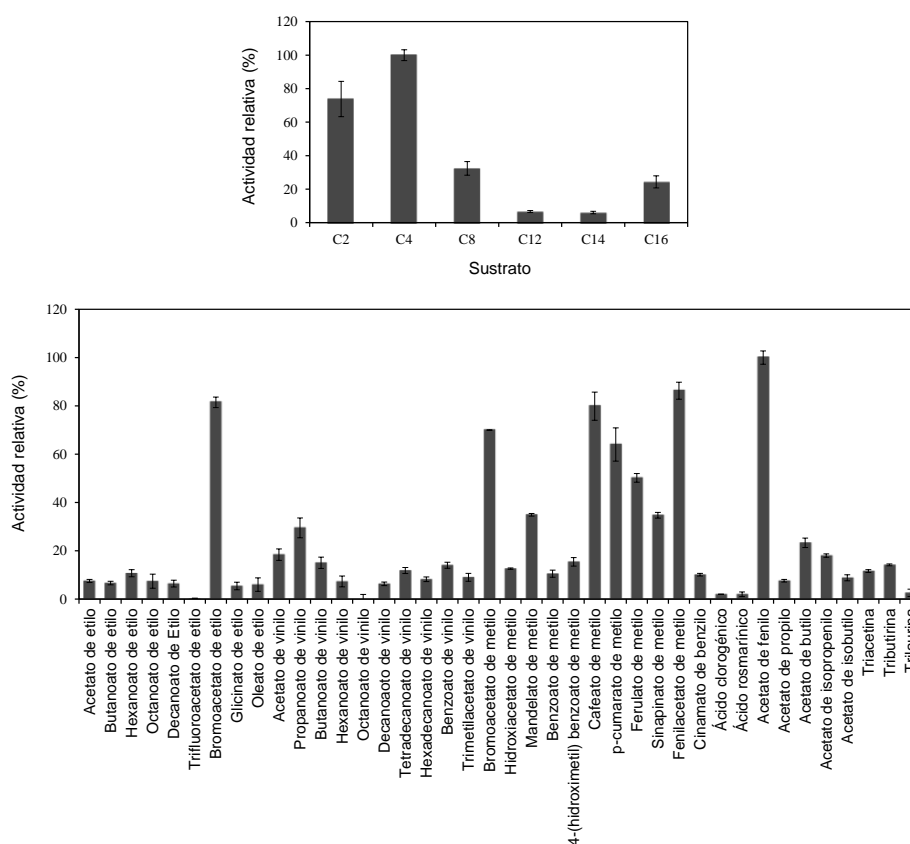


Figura 14. Especificidad de sustrato de Lp_0796 frente a (A) sustratos cromogénicos (ésteres de *p*-nitrofenilo) con diferente longitud de la cadena acilo (C₂, acetato; C₄, butirato; C₈, caprilato; C₁₂, laurato; C₁₄, miristato; C₁₆, palmitato) o (B) una librería general de ésteres. Se representa la actividad relativa obtenida con los diferentes sustratos. Las barras de error representan la desviación estándar estimada de tres ensayos independientes. La máxima actividad obtenida se definió como el 100%.

1.3.2. Lp_0973

Al inicio de esta tesis, Brod y colaboradores describieron la caracterización de la esterasa Lp_0973 (Brod, et al., 2010). A pesar de que analizaron la actividad esterasa de la enzima utilizando ésteres derivados de *p*-nitrofenilo, no estudiaron su actividad frente a otros ésteres, por lo que no determinaron su especificidad tanto por el grupo alcohol como por el grupo ácido, así como tampoco su actividad sobre ésteres aromáticos.

Con objeto de hacer un estudio más exhaustivo de la especificidad de sustrato de la proteína Lp_0973, se decidió hiperproducir y purificar la proteína recombinante. Para ello, se clonó el gen *lp_0973* de la cepa *L. plantarum* WCFS1 en el vector de expresión pURI3-TEV (Curiel et al., 2011) utilizando los oligonucleótidos 563 y 564 que amplifican un fragmento de 1017 pb. Estos oligonucleótidos permiten la clonación en el vector pURI3-TEV mediante el método LIC (Curiel et al., 2011). El plásmido recombinante pURI3-TEV-0973 se propagó en la cepa de *E. coli* DH10B y una vez verificada su secuencia, se transfirió a la cepa *E. coli* BL21 (DE3) para la hiperproducción de la proteína.

La proteína esterasa recombinante His₆-Lp_0973 se purificó en las mismas condiciones que las descritas para la proteína Lp_0796 y posteriormente se dializó para eliminar los restos del mismo. La proteína se produjo de forma soluble pero en poca cantidad, por ello se decidió coproducirla con chaperonas (GroEs/GroEL) para mejorar la producción. Una vez purificada y dializada la enzima Lp_0973, se realizó una electroforesis en geles SDS-PAGE para comprobar la hiperproducción de la enzima recombinante. En la Figura 15 se puede comprobar que, tanto en el extracto soluble procedente de las células de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con el plásmido pURI3-TEV-*lp_0973* como en las diferentes fracciones eluidas de la columna de afinidad con imidazol, aparece la proteína Lp_0973 recombinante con un tamaño aproximado de 37 kDa que coincide con el peso molecular esperado (36.7 kDa). Mediante el protocolo de hiperproducción y purificación descrito se obtuvieron 13 mg de proteína pura por litro de cultivo.

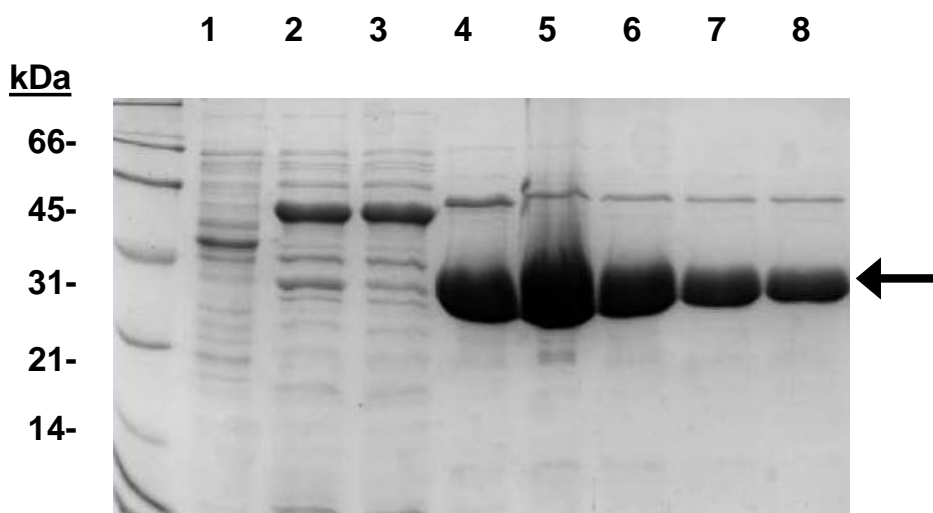


Figura 15. Hiperproducción y purificación de la proteína Lp_0973 recombinante de *L. plantarum* WCFS1. 1, extracto proteico soluble procedente de células inducidas con IPTG *E. coli* BL21 (DE3) (pURI3-TEV); 2, extracto proteico soluble de células *E. coli* BL21 (DE3) (pURI3-TEV-0973) (pGRO7); 3, fracción eluida no retenida en la resina de afinidad; 4-8 fracciones eluidas de la columna de afinidad con imidazol (150 mM). El marcador de peso molecular *Broad-Range* (Bio-Rad), está representado a la izquierda. Gel SDS-PAGE 12,5% de acrilamida.

Inicialmente se ensayó la actividad esterasa frente a ésteres derivados de *p*-nitrofenilo (Figura 16A). La esterasa Lp_0973 mostró la máxima actividad frente a ésteres de cadena acilo corta, acetato de *p*-nitrofenilo (C2) y butirato de *p*-nitrofenilo (C4), no detectándose actividad sobre el resto de ésteres probados. Este perfil de actividad coincide con el descrito previamente (Brod, et al., 2010), y es característico de carboxilesterasas (EC 3.1.1.1), que actúan principalmente sobre ésteres de cadena acilo corta solubles en agua. La arilesterasa EstA de *L. helveticus* presentó una especificidad de sustrato similar ya que hidrolizó ésteres de cadena corta, no actuando sobre los de cadena larga (Fenster et al., 2000), al igual que EstCOo8 y EstC34 de *O. oeni* y *L. hilgardii* respectivamente {Sumby, 2013 #90}. Por el contrario, la arilesterasa EstB de *L. casei* LILA, EstA de *L. lactis* y una esterasa de *L. casei* CL96 presentaron mayor actividad sobre derivados de cadena media (C6-C8) (Choi, et al., 2004, Fenster, et al., 2003).

Teniendo en cuenta que no se había estudiado el rango de sustratos que hidroliza Lp_0973 y para evaluar su actividad sobre ésteres aromáticos se ensayó su actividad frente a una librería de ésteres (Figura 16B). Entre los ésteres ensayados Lp_0973 presentó una actividad significativa sobre acetato

de fenilo (86%), aunque la máxima actividad fue sobre triacetina (Figura16B). Aunque Lp_0973 presentó actividad sobre la mayoría de ésteres probados, destaca su actividad sobre otros ésteres de acetato como bromoacetato de metilo y etilo y acetato de isopropenilo entre otros. Estos resultados indican que la actividad hidrolítica de Lp_0973 se dirige preferentemente sobre ésteres con una parte ácida pequeña (acetatos y butiratos) pero con grupos alcohol voluminosos (fenol y glicerol). La esterasa Lp_0973 es una arilesterasa, ya que hidrolizó ésteres aromáticos como el acetato de fenilo, que es un sustrato utilizado para identificar arilesterasas {Wang, 2010 #83}. Las enzimas arilesterasas se han estudiado menos que otros tipos de esterasas, especialmente carboxilesterasas o lipasas (Park et al., 2008). Hasta la fecha se han descrito pocas arilesterasas bacterianas y su función fisiológica permanece desconocida. Se han descrito arilesterasas de *Vibrio mimicus* (Shaw et al., 1994), *Agrobacterium radiobacter* (sakai et al., 1998), *Acinetobacter* sp. (Jones et al., 1999), *Pseudomonas fluorescens* (Cheeseman e al., 2004) y *Sulfolobus solfataricus* (Park et al., 2008). Entre las bacterias lácticas únicamente se han descrito arilesterasas de *Lactobacillus helveticus* (Fenster et al., 2000) y *Lactobacillus casei* (Fenster, et al., 2003). Finalmente, con respecto a bacterias relacionadas con el vino, se ha descrito recientemente una arilesterasa de *Gluconobacter oxydans* (Navarro-Gonzalez, et al., 2012). Lp_0973 además es capaz de hidrolizar triacetina. Previamente se han descrito esterasas en *L. plantarum* que hidrolizan triacetina (Oterholm et al., 1972) y tributirina (GOBBETTI, et al., 1996); Gobbetti et al., 1996), pero hasta la fecha no se habían descrito arilesterasas en *L. plantarum*, por lo tanto, Lp_0973 es la primera arilesterasa descrita en dicha cepa

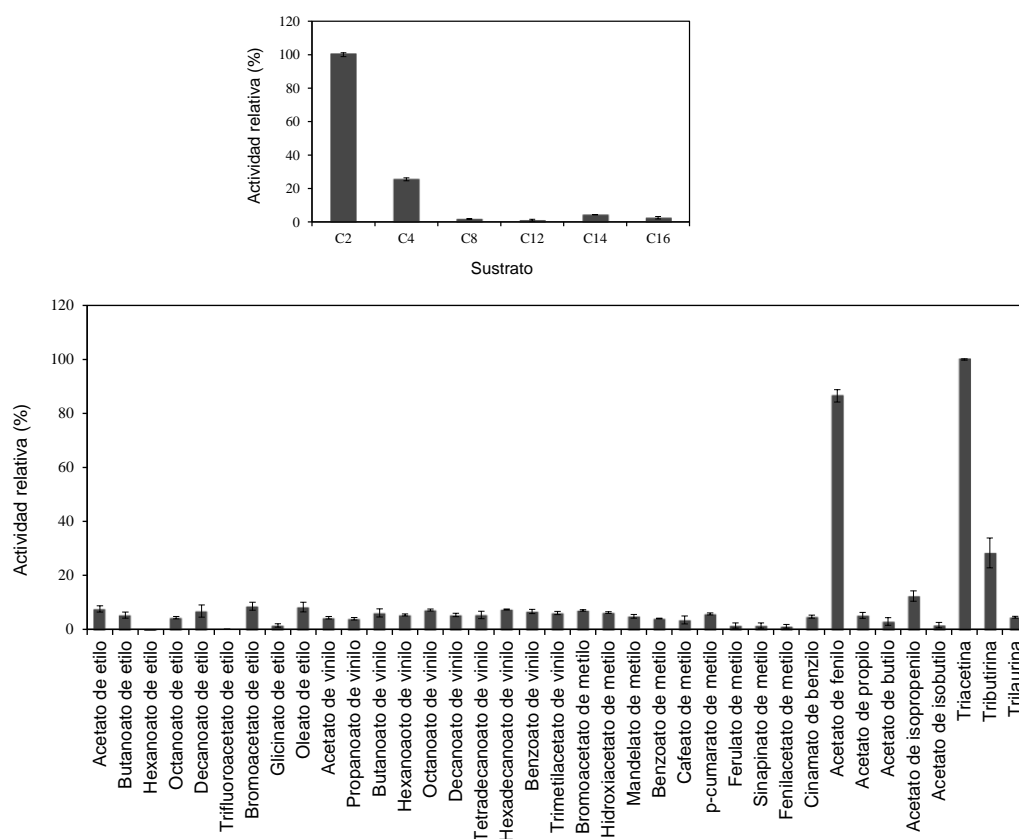


Figura 16. Especificidad de sustrato de Lp_0973 frente a (A) sustratos cromogénicos (ésteres de *p*-nitrofenilo) con diferente longitud de la cadena acilo (C₂, acetato; C₄, butirato; C₈, caprilato; C₁₂, laurato; C₁₄, miristato; C₁₆, palmitato) o (B) una librería general de ésteres. Se representa la actividad relativa obtenida con los diferentes sustratos. Las barras de error representan la desviación estándar estimada de tres ensayos independientes. La máxima actividad obtenida se definió como el 100%.

1.3.3. Lp_1002

El tercero ORF anotado como posible esterasa en el genoma de *L. plantarum* WCFS1 es *lp_1002*. La proteína Lp_1002 presenta un 53% de identidad con proteínas anotadas como posibles esterasas o lipasas de *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus coryniformis* y, al igual que ellas, presenta el motivo conservado Gly₁₁₁-X-Ser₁₁₂-X-Gly₁₁₅ típico de serín hidrolasas, además del Asp₁₉₆ y la His₂₂₉ de la triada catalítica.

Con objeto de estudiar la actividad bioquímica de la proteína Lp_1002, se clonó el gen *lp_1002* de la cepa *L. plantarum* WCFS1 en el vector de expresión pURI3-TEV (Curiel et al., 2011). Para amplificar el gen *lp_1002*, se diseñaron los oligonucleótidos 565 y 566 que amplifican un fragmento de 795 pb. En este caso, no se consiguió hiperproducir la proteína recombinante, en ninguna de las condiciones ensayadas, por lo que se decidió clonar el gen *lp_1002* en el vector de expresión pURI3-Cter que añade una cola de 6 histidinas en el extremo C-terminal de la proteína recombinante (Curiel et al., 2011), empleando en este caso los oligonucleótidos 959 y 960 que hibridan con el vector de expresión pURI3-Cter, permitiendo una clonación independiente de ligación. El plásmido recombinante pURI3-Cter-1002 se propagó en la cepa de *E. coli* DH10B y una vez verificada su secuencia, se transfirió a la cepa *E. coli* BL21 (DE3) para la hiperproducción de la proteína. En este caso, la proteína que presenta un peso molecular aparente de 29 kDa apareció en cuerpos de inclusión en la fracción insoluble. Para conseguir hiperproducir la proteína de forma soluble, se utilizó el plásmido pGro7 que produce el sistema de chaperonas GroES/GroEL. Cuando se utilizaron simultáneamente los plásmidos pURI3-Cter-1002 y pGRO7, Lp_1002 apareció en la fracción soluble intracelular.

La proteína Lp_1002 se purificó, se eluyó de la columna con imidazol (150 mM) y posteriormente se dializó. En análisis mediante SDS-PAGE (Figura 17) se puede comprobar la hiperproducción de la enzima que, tanto en el extracto soluble procedente de las células de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con el plásmido pURI3-TEV-1002 como en las diferentes fracciones eluidas de la columna de afinidad con imidazol, aparece la proteína Lp_1002 recombinante con un tamaño aproximado de 29 kDa que coincide con el peso molecular esperado (28.7 kDa). Se obtuvo un rendimiento de 20 mg de proteína pura por litro de cultivo.

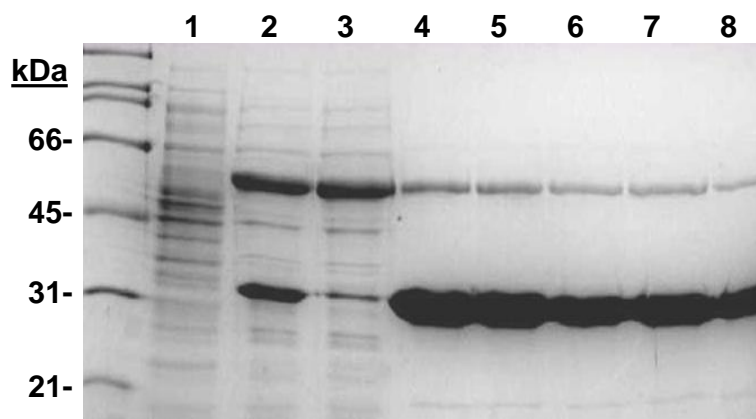


Figura 17. Hiperproducción y purificación de la proteína Lp_1002 recombinante de *L. plantarum* WCFS1. 1, extracto proteico soluble procedente de células inducidas con IPTG *E. coli* BL21 (DE3) (pURI3-TEV); 2, extracto proteico soluble de células *E. coli* BL21 (DE3) (pURI3-TEV-1002) (pGro7); 3, fracción eluída no retenida en la resina de afinidad; 4-8 fracciones eluídas de la columna de afinidad con imidazol (150 mM). Gel SDS-PAGE 12,5% de acrilamida. El marcador de peso molecular *Broad-Range* (Bio-Rad), está representado a la izquierda.

En el ensayo de actividad utilizando derivado de *p*-nitrofenilo, la esterasa Lp_1002 mostró actividad sólo frente a derivados con longitudes de cadena acilo cortas, presentando preferencia por acetato de *p*-nitrofenilo (C2 (Figura 18A. Este resultado confirma que Lp_1002 es una esterasa con una selectividad muy marcada sobre acetato de *p*-nitrofenilo. Se ha descrito una arilesterasa que presenta la máxima actividad sobre acetato de *p*-nitrofenilo y que al igual que Lp_1002 presentó una actividad considerablemente menor sobre butirato de *p*-nitrofenilo y no detectándose actividad sobre otros ésteres derivados de *p*-nitrofenilo con una longitud de cadena larga (Wang et al., 2011). Además, se ha descrito una SGNH-arilesterasa de la bacteria Gram-negativa *Sinorhizobium meliloti* 1021 que al igual que Lp_1002 sólo hidrolizó eficazmente acetato de *p*-nitrofenilo (Hwang et al., 2010)

Como se ha mencionado anteriormente, es difícil diferenciar los distintos tipos de esterases mediante comparación de sus secuencias. Una vez confirmado que Lp_1002 presenta actividad esterasa y con objeto de analizar el rango de sustratos de la enzima, se ensayó su actividad frente a una librería de ésteres {Liu, 2001 #127}. Como se observa en la Figura 18B, Lp_1002 presentó una mayor actividad hidrolítica sobre acetato de fenilo. El acetato de fenilo es el sustrato utilizado generalmente para identificar arilesterasas {Wang,

2010 #83}. Por lo tanto, Lp_1002 y la estreasa que acabamos de describir Lp_0973 son las primeras arilesterasas descritas en *L. plantarum*. El estudio de las secuencias de aminoácidos de las arilesterasas bacterianas presentó menos de un 20% de identidad entre ellas. Cabe destacar que la Lp_1002 presentó una mayor identidad de secuencia con las arilesterasas de *G. oxydans* (16% de identidad), *P. fluorescens* (16%) y *L. casei* (14%).

Las arilesterasas bacterianas se pueden utilizar con fines industriales, especialmente si se considera el hecho de que presentan una amplia especificidad de sustrato (Shaw et al., 1994). En este caso, aunque con una actividad más baja que sobre acetato de fenilo, Lp_1002 hidrolizó la mayoría de los sustratos ensayados (Figura 18B). Lp_1002 catalizó así la hidrólisis de ésteres pequeños activados y ésteres pequeños inactivados independientemente de su tamaño. Ésteres grandes activados, como por ejemplo el decanoato de vinilo se hidrolizaron de manera similar que ésteres grandes inactivados como el decanoato de etilo. En cuanto a la selectividad por la cadena acilo, Lp_1002 presentó actividad sobre todos los ésteres de etilo, ésteres de vinilo y ésteres de metilo ensayados, presentando distinta longitud de la cadena acilo así como también grupos de electrones desapareados (bromoacetato de etilo y glicinato de etilo) o un grupo cargado (benzoato de vinilo y trimetilacetato de vinilo). En cuanto a la selectividad por el grupo alcohol, también se hidrolizaron acetatos y butiratos. De todos los sustratos analizados, Lp_1002 no hidrolizó únicamente trifluoroacetato de etilo, ácido clorogénico y ácido rosmarínico. El amplio rango de sustratos que presentó Lp_1002 indica su capacidad para utilizarla en las fermentaciones de alimentos. De los sustratos incluidos en la librería de ésteres, Lp_1002 hidrolizó algunos ésteres relevantes para el aroma como el acetato de etilo (aroma a piña), butanoato de etilo (floral, afrutado), hexanoato de etilo (manzana verde), octanoato de etilo (jabón dulce) y decanoato de etilo (floral) (Bartowsky y Pretorius, 2008).

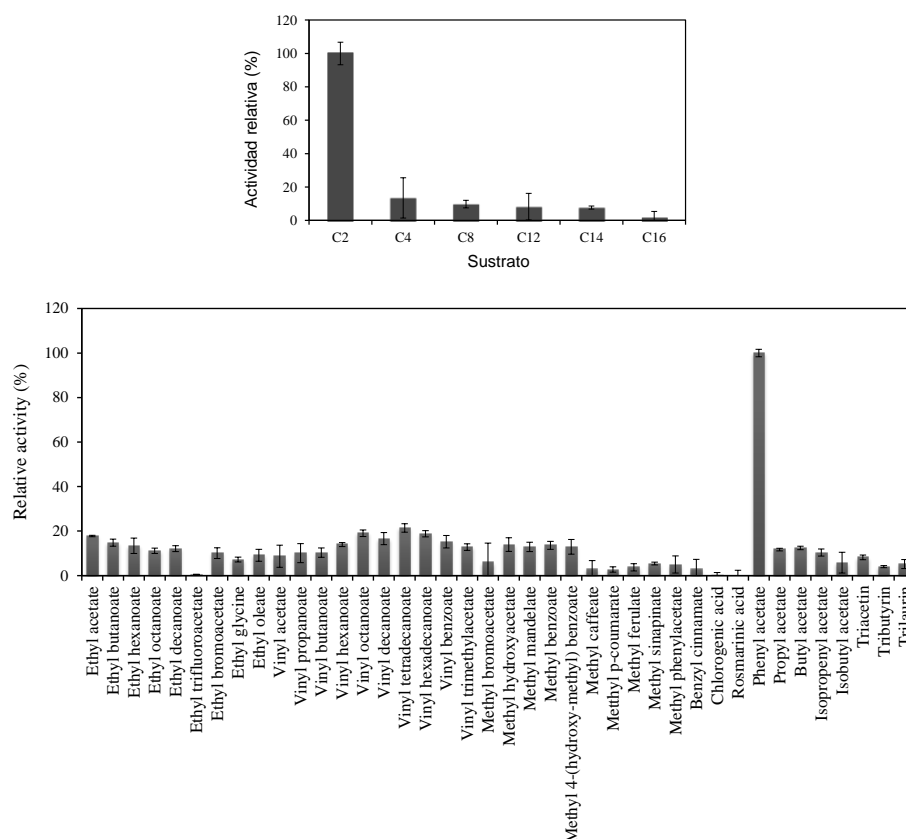


Figura 18. Especificidad de sustrato de Lp_1002 frente a (A) sustratos cromogénicos (ésteres de *p*-nitrofenilo) con diferente longitud de la cadena acilo (C₂, acetato; C₄, butirato; C₈, caprilato; C₁₂, laurato; C₁₄, miristato; C₁₆, palmitato) o (B) una librería general de ésteres. Se representa la actividad relativa obtenida con los diferentes sustratos. Las barras de error representan la desviación estándar estimada de tres ensayos independientes. La máxima actividad obtenida se definió como el 100%.

1.3.4. Lp_1760

Como se ha mencionado anteriormente, la proteína Lp_1760 se encuentra anotada como lipasa/esterasa en la cepas secuenciadas de *L. plantarum* WCFS1 lo que indica que su actividad bioquímica no está bien definida.

Con el fin de conocer los posibles sustratos hidrolizados por la proteína Lp_1760, inicialmente se clonó el gen *lp_1760* de la cepa *L. plantarum* WCFS1 en el vector pURI3-TEV empleando los oligonucleótidos 567 y 568 para

amplificar el gen. En estas condiciones se consiguió proteína soluble, pero con un bajo rendimiento. La coexpresión con pGRO7 tampoco mejoró el rendimiento obtenido previamente, por lo que en base a los buenos resultados obtenidos con Lp_1002, se decidió clonar el gen en el vector de expresión pURI3-Cter. Para amplificar el gen *lp_1760*, se diseñaron los oligonucleótidos 1220 y 1221 que amplifican un fragmento de 753 pb e hibridan con el vector de expresión pURI3-Cter, permitiendo una clonación independiente de ligación. El plásmido recombinante pURI3-Cter-1760 se propagó en la cepa de *E. coli* DH10B, y se transfirió a la cepa *E. coli* BL21 (DE3) para la hiperproducción de la proteína. Posteriormente, la proteína esterasa recombinante Lp_1760 se purificó en un único paso y posteriormente se dializó.

La clonación en el vector pURI3-Cter, consiguió mejorar la producción de la proteína, que presenta un peso molecular estimado de 29 kDa aproximadamente, aunque la mayoría de la proteína continuaba encontrándose en cuerpos de inclusión. En este caso, el empleo de chaperonas no mejoró la producción de la proteína Lp_1760 soluble, por lo que se decidió caracterizar la proteína recombinante Lp_1760 con las colas de histidinas en el extremo C-terminal sin la presencia de chaperonas.

Para comprobar la hiperproducción y purificación de la proteína, se llevó a cabo una electroforesis en geles SDS-PAGE al 12.5% de acrilamida. En la Figura 19 se puede comprobar que en las fracciones eluidas de la columna de afinidad con imidazol, aparece la proteína Lp_1760 recombinante con un tamaño aproximado de 29 kDa, aunque con un bajo rendimiento (8 mg por litro de cultivo).

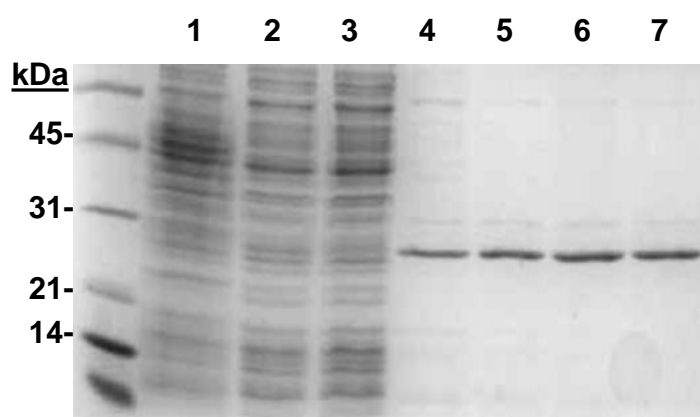


Figura 19. Hiperproducción y purificación de la proteína Lp_1760 recombinante de *L. plantarum* WCFS1. 1, extracto proteico soluble procedente de células inducidas con IPTG *E. coli* BL21 (DE3) (pURI3-Cter); 2, extracto proteico soluble de células *E. coli* BL21 (DE3) (pURI3-Cter-1760); 3, fracción eluída no retenida en la resina de afinidad; 4-8 fracciones eluídas de la columna de afinidad con imidazol (150 mM). Gel SDS-PAGE 12,5% de acrilamida. El marcador de peso molecular *Broad-Range* (Bio-Rad), está representado a la izquierda.

En el ensayo de actividad esterasa sobre ésteres derivados de pNF (Figura 20A), Lp_1760 mostró actividad máxima frente a derivados de pNF con longitudes de cadena acilo cortas, como acetato de *p*-nitrofenilo (C2) (50%) y la máxima actividad frente a butirato de *p*-nitrofenilo (C4) (100%). En este caso, la proteína Lp_1760 presentó actividad frente a ésteres de cadena media como octanoato de *p*-nitrofenilo (27%) y el palmitato de *p*-nitrofenilo (35%). La hidrólisis de ésteres de cadena larga sugiere que la proteína Lp_1760 presenta actividad lipasa. Una de las diferencias entre esterasas y lipasas es que las lipasas son capaces de degradar ésteres de cadena acilo larga insolubles en agua (Bornscheuer 2002). Una tributirín esterasa (EstA) descrita en *L. lactis* B1014 presentó una especificidad de sustratos similar hidrolizando preferentemente butirato de *p*-nitrofenilo, pero también ésteres de cadena acilo larga {Fernández, 2000 #101}. La esterasa intracelular E1 parcialmente caracterizada de *L. plantarum* 2739 presentó una actividad similar (Gobbetti et al., 1997). Todas las esterasas descritas previamente y que presentan una especificidad de sustrato similar a Lp_1760 hidrolizaron además tributirina. Los resultados obtenidos mediante la librería de ésteres revelaron que Lp_1760 no hidrolizó la mayoría de los sustratos ensayados (Figura 20B). Sin embargo,

Lp_1760 presentó la máxima actividad frente a tributirina, presentando también actividad sobre triacetina, acetato de fenilo, hidroxiacetato de metilo y octanoato de vinilo (Figura 20B). La tributirina es un componente habitual para identificar actividad lipasa, por lo que Lp_1760 es una lipasa. Previamente, se han purificado parcialmente enzimas con actividad tributirin esterasa en *L. plantarum* (Andersen et al., 1995; Gobbetti et al., 1996; Gobbetti et al., 1997; (Lopes Mde, et al., 2002), sin embargo, ninguna de ellas se ha identificado genéticamente. De este modo, Lp_1760 es la primera proteína de *L. plantarum* producida recombinantemente que presenta actividad lipasa.

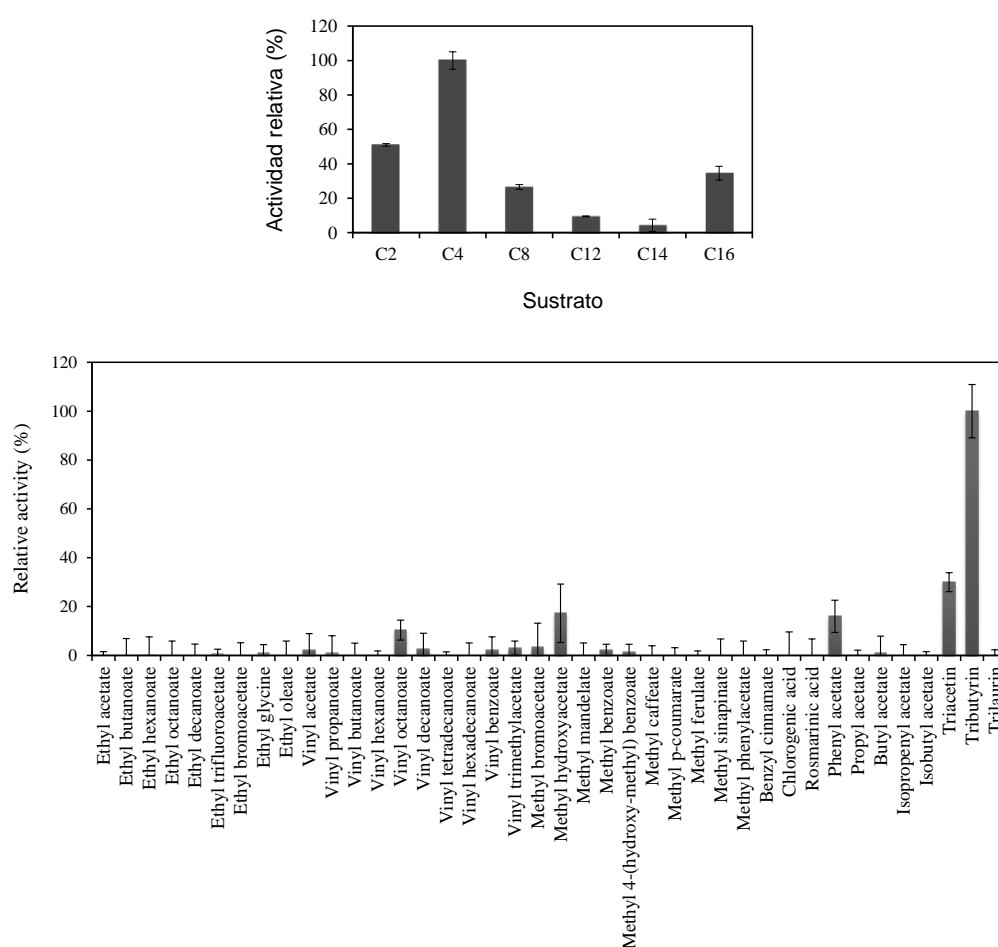


Figura 20. Especificidad de sustrato de Lp_1760 frente a (A) sustratos cromogénicos (ésteres de *p*-nitrofenilo) con diferente longitud de la cadena acilo (C₂, acetato; C₄, butirato; C₈, caprilato; C₁₂, laurato; C₁₄, miristato; C₁₆, palmitato) o (B) hacia una librería general de ésteres. Se representa la actividad relativa obtenida con los diferentes sustratos. Las barras de error representan la desviación estándar estimada de tres ensayos independientes. La máxima actividad obtenida se definió como el 100%.

1.3.5. Lp_2631

L. plantarum WCFS1 presenta en su genoma la proteína Lp_2631 anotada como “lipasa/esterasa” que no se ha caracterizado previamente. Con objeto de conocer la especificidad enzimática de esta proteína, se hiperprodujo y purificó así como también se realizó su caracterización bioquímica. Para ello, el gen *lp_2631* se amplificó utilizando los oligos 569 y 570 y se clonó en el vector pURI3-TEV. El plásmido recombinante pURI3-TEV-2631 se propagó en la cepa *E. coli* DH10B y una vez verificada su secuencia, se transfirió a la cepa *E. coli* BL21 (DE3) para la hiperproducción de la proteína recombinante. La hiperproducción de la proteína recombinante se realizó probando distintas condiciones de inducción, sin embargo la proteína Lp_2631 no se hiperprodujo en ninguna de las condiciones ensayadas en el medio LB, así como tampoco cuando se utilizó el medio mínimo M9. Además en ambos casos se observó que la proteína no se hiperproducía. Cuando se co-expresó la proteína Lp_2631 con el sistema de chaperonas groEL-groES, se observó un elevado rendimiento en la hiperproducción de la proteína. La proteína recombinante producida se purificó mediante elución con tampón fosfato pH 7 conteniendo NaCl 300 mM e imidazol 150 mM. Pese al elevado rendimiento obtenido en la purificación de la proteína Lp_2631 en presencia de las chaperonas la proteína no fue estable y precipitó. Por si el pH del tampón en el que se encontraba la enzima influía en la estabilidad de la misma, se purificó la proteína Lp_2631 utilizando tampón a pH ácido (McIlvaine 150 mM pH 5) (Sumbly, et al., 2009). En este último caso no fue necesario dializar la enzima puesto que el tampón de elución no contenía imidazol y se consiguió mejorar la estabilidad de la enzima. La elución a pH 5 consiguió mejorar la estabilidad de la enzima y evitar su precipitación durante su purificación.

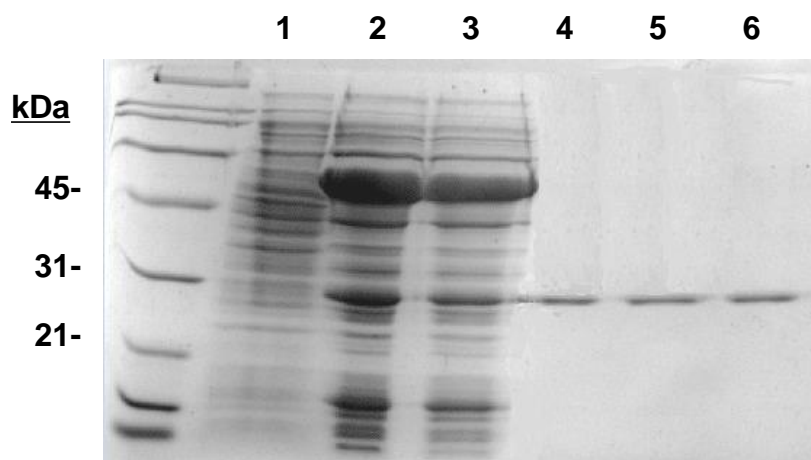


Figura 21. Hiperproducción y purificación de la proteína Lp_2631 recombinante de *L. plantarum* WCFS1. 1, extracto proteico soluble procedente de células inducidas con IPTG *E. coli* BL21 (DE3) (pURI3-Cter); 2, extracto proteico soluble de células *E. coli* BL21 (DE3) (pURI3-Cter-2631); 3, fracción eluída no retenida en la resina de afinidad; 4-8 fracciones eluídas de la columna de afinidad con pH ácido. Gel SDS-PAGE 12,5% de acrilamida. El marcador de peso molecular *Broad-Range* (Bio-Rad), está representado a la izquierda.

Una vez obtenida la proteína Lp_2631 pura, con un rendimiento de 8 mg de proteína por litro de cultivo, se comprobó su actividad esterasa mediante el ensayo colorimétrico con derivados de *p*-nitrofenilo (C2-C16) (Figura 22A). La enzima sólo presentó actividad sobre ésteres de cadena acilo corta, acetato de *p*-nitrofenilo (C2) (100%) y butirato de *p*-nitrofenilo (C4) (50%), detectándose una actividad mínima sobre cadenas acilo largas. Estos resultados indican que Lp_2631 es una esterasa. La especificidad de sustrato mostrada por Lp_2631 es bastante frecuente entre esterasas de otras bacterias lácticas descritas (Fenster et al., 2000; (Sumby, et al., 2009). Las esterasas Lp_0973 y Lp_1002 descritas en previamente en este trabajo también hidrolizaron más eficazmente acetato de *p*-nitrofenilo.

Con objeto de analizar el rango de sustratos de Lp_2631 se ensayó su actividad frente a una librería de ésteres, especialmente para evaluar su actividad sobre ésteres aromáticos. Como se observa en la Figura 22B, Lp_2631 solamente hidrolizó eficazmente acetato de fenilo. Este resultado sugiere que la enzima Lp_2631 es una arilesterasa (EC 3.1.1.2) muy selectiva

actuando preferencialmente sobre ésteres cuyo grupo alcohol es un grupo aromático, al igual que la arilesterasa de *L. helveticus* CNRZ32 (Fenster et al., 2000), esterasa-1 y esterasa-2 de *A. pasteurianus* (Kashima et al., 1998), EstB de *L. casei* LILA (Fenster et al., 2003) y Est0881 de *G. oxidans* 621H (Navarro-Gonzalez, et al., 2012). Las esterases Lp_0973 y Lp_1002 descritas en este trabajo también presentaron actividad arilesterasa ya que hidrolizaron preferentemente acetato de fenilo.

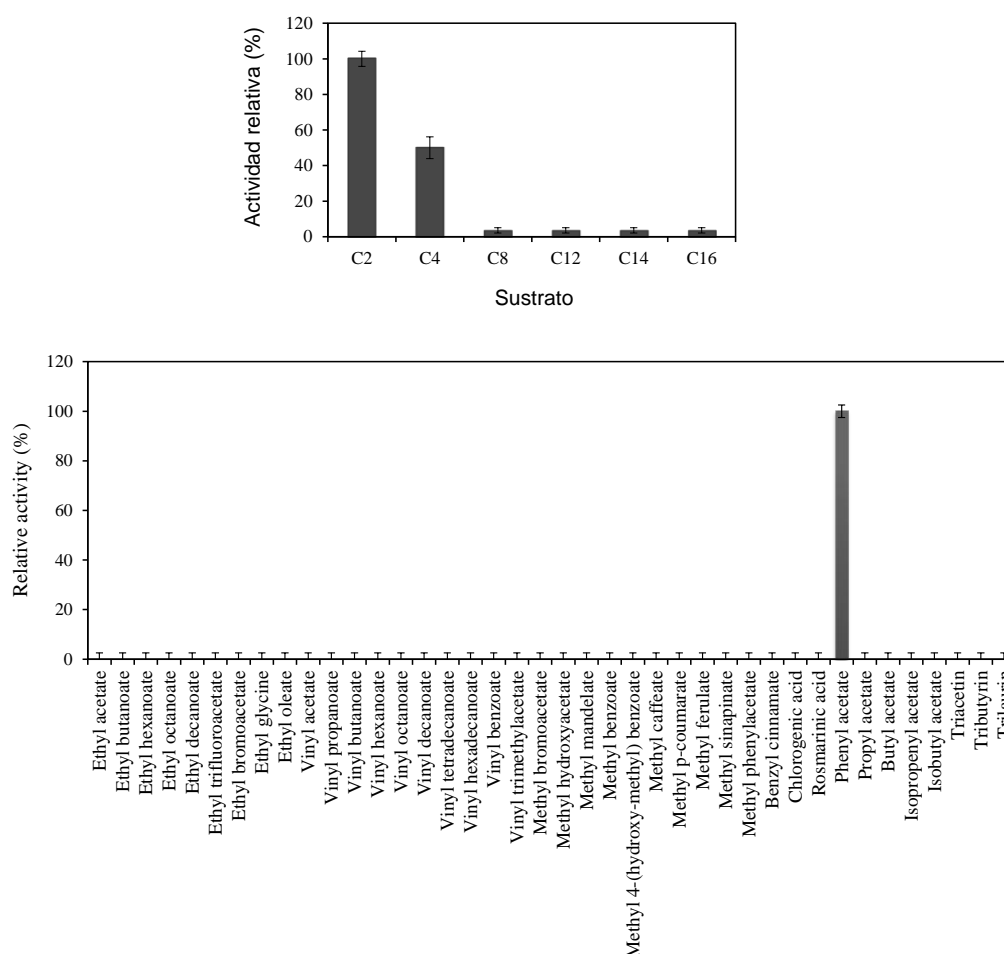


Figura 22. Especificidad de sustrato de Lp_2631 frente a (A) sustratos cromogénicos (ésteres de *p*-nitrofenilo) con diferente longitud de la cadena acilo (C₂, acetato; C₄, butirato; C₈, caprilato; C₁₂, laurato; C₁₄, miristato; C₁₆, palmitato) o (B) hacia una librería general de ésteres. Se representa la actividad relativa obtenida con los diferentes sustratos. Las barras de error representan la desviación estándar estimada de tres ensayos independientes. La máxima actividad obtenida se definió como el 100%.

1.3.6. Lp_2923

Con objeto de conocer la actividad de la proteína Lp_2923 anotada como “esterasa/lipasa” de *L. plantarum* WCFS1 sobre ésteres aromáticos, se decidió hiperproducir la proteína recombinante, purificarla y caracterizar su rango de sustratos. Inicialmente, el gen *lp_2923* se clonó utilizando los oligos 571 y 572 en el vector pURI3-TEV que intrduce una cola de seis histidinas en el extremo N-terminal. A pesar de que la proteína se hiperprodujo correctamente resultó ser parcialmente inestable en solución. Previamente, se había depositado en la base de datos de dos consorcios de cristalografía la esterasa Lp_2923 recombinante con la cola de histidinas en el extremo C-terminal.

Por ello, se decidió producir la proteína con la cola de histidinas en el extremo C-terminal para conocer su especificidad de sustratos. Para ello, se clonó el gen *lp_2923* de la cepa *L. plantarum* WCFS1 en el vector pURI3-Cter (Curiel et al., 2011), utilizando los oligonucleótidos 856 y 857. El plásmido recombinante pURI3-Cter-2923 se propagó en la cepa *E. coli* DH10B y una vez verificada su secuencia, se transfirió a la cepa *E. coli* BL21 (DE3) para la hiperproducción de la proteína recombinante. La proteína se purificó utilizando imidazol 150 mM y se dializó. Posteriormente, se realizó una electroforesis en geles SDS-PAGE de acrilamida para comprobar la hiperproducción de la enzima esterasa recombinante. Como se observa en la Figura 23, tanto en el extracto soluble procedente de las células de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con el plásmido pURI3-Cter-2923 como en las fracciones eluidas aparecen las bandas correspondientes a la hiperproducción de la proteína Lp_2923 con un peso molecular aproximado de 32 kDa. Mediante el procedimiento descrito se obtuvieron 20 mg de enzima esterasa por litro de cultivo

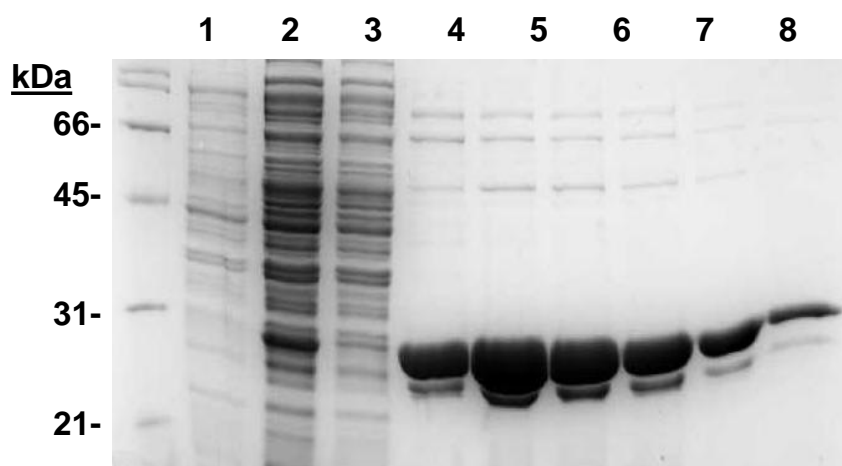


Figura 23. Hiperproducción y purificación de la proteína Lp_2923 recombinante de *L. plantarum* WCFS1. 1, extracto proteico soluble procedente de células inducidas con IPTG *E. coli* BL21 (DE3) (pURI3-Cter); 2, extracto proteico soluble de células *E. coli* BL21 (DE3) (pURI3-Cter-2923); 3, fracción eluída no retenida en la resina de afinidad; 4-8 fracciones eluídas de la columna de afinidad con imidazol (150 mM). Gel SDS-PAGE 12,5% de acrilamida. El marcador de peso molecular *Broad-Range* (Bio-Rad), está representado a la izquierda.

Una vez purificada la enzima Lp_2923 de *L. plantarum* WCFS1 se analizó la especificidad de sustrato frente a ésteres derivados de *p*-NF de distinta longitud de la cadena acilo (C2-C16). La esterasa Lp_2923 fue más selectiva sobre ésteres de cadena acilo corta como acetato de *p*-nitrofenilo y butirato de *p*-nitrofenilo y va disminuyendo progresivamente la actividad según aumenta la longitud de la cadena acilo (Figura 24A). Por lo tanto, la enzima Lp_2923 es una esterasa con una especificidad de sustrato similar a otras esterasas de bacterias lácticas descritas previamente. Una arilesterasa de *L. helveticus* CNRZ32 presentó mayor actividad sobre acetato de *p*-nitrofenilo y butirato de *p*-nitrofenilo, no hidrolizando los de cadena larga (Fenster et al., 2000) y EstCOo8 y EstC34 de *O. oeni* y *L. hilgardii* respectivamente {Sumby, 2013 #90}. La esterasa intracelular EstB28 de *O. oeni* Ooeni28, también presentó mayor actividad sobre pNPA y pNPB, aunque además hidrolizó eficazmente pNPO (Sumby, et al., 2009). Otras esterasas de *L. plantarum* WCFS1 descritas previamente en este trabajo como Lp_0973, Lp_1002 y Lp_2631 también mostraron su máxima actividad sobre acetato de *p*-nitrofenilo.

La esterasa presentó el máximo de actividad sobre acetato de fenilo y una actividad minoritaria sobre bromoacetato de metilo y acetato de isopropenilo, no mostrando actividad sobre el resto de sustratos analizados (Figura 24B). Este espectro de actividad sugiere que la enzima Lp_2923 presenta una especificidad más amplia por la parte alcohol del sustrato y una preferencia por partes ácidas pequeñas.

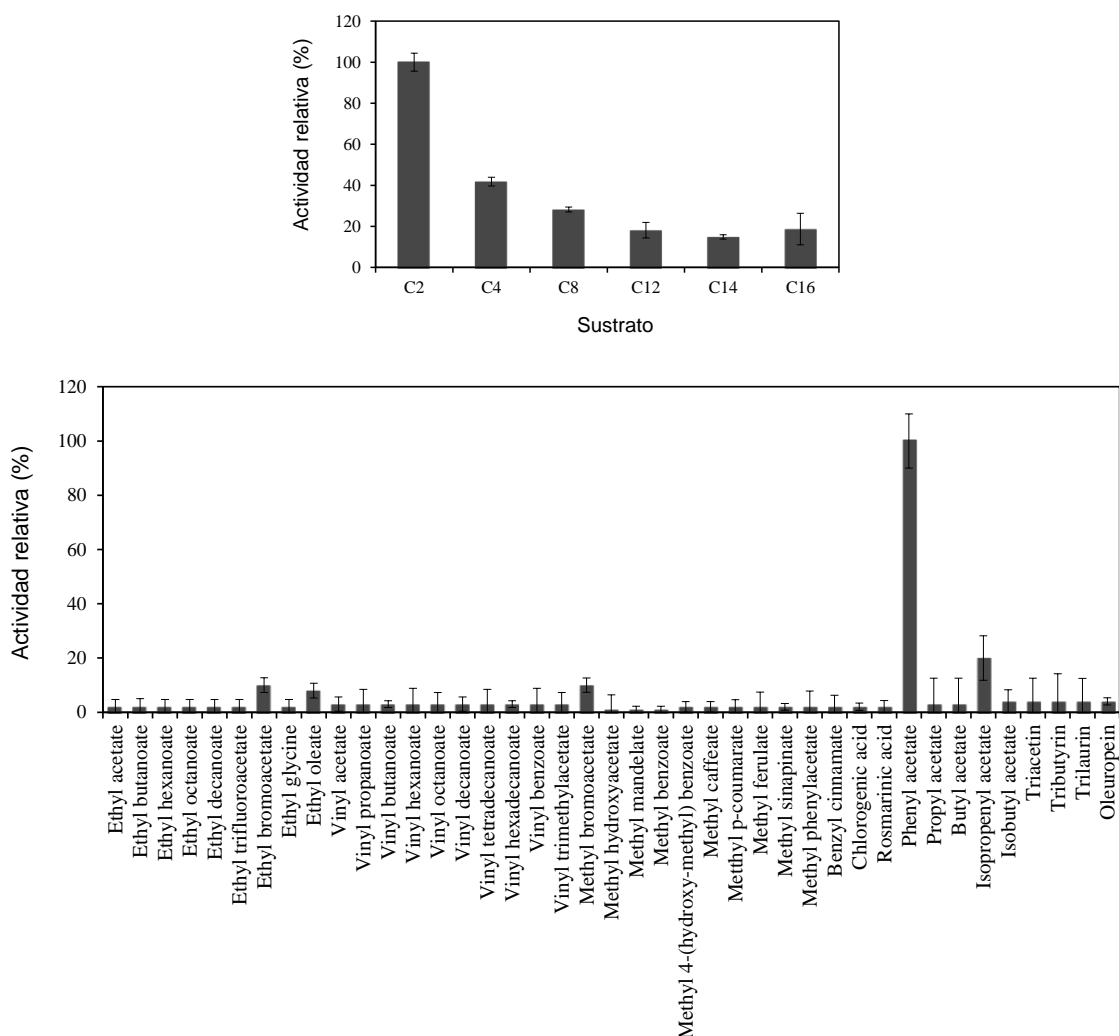


Figura 24. Especificidad de sustrato de Lp_2923 frente a (A) sustratos cromogénicos (ésteres de *p*-nitrofenilo) con diferente longitud de la cadena acilo (C₂, acetato; C₄, butirato; C₈, caprilato; C₁₂, laurato; C₁₄, miristato; C₁₆, palmitato) o (B) hacia una librería general de ésteres. Se representa la actividad relativa obtenida con los diferentes sustratos. Las barras de error representan la desviación estándar estimada de tres ensayos independientes. La máxima actividad obtenida se definió como el 100%.

Teniendo en cuenta la hidrólisis mayoritaria de acetato de fenilo, la enzima Lp_2923 es una arilesterasa (EC 3.1.1.2), siendo más selectiva sobre ésteres con grupo alcohol aromático, al igual que las arilesterasas Lp_0973, Lp_1002 y Lp_2631 de *L. plantarum* WCFS1 descritas previamente. Entre las bacterias lácticas, se han descrito arilesterasas en *L. helveticus* CNRZ32 (Fenster et al., 2000), en *A. pasteurianus* (esterasa-1 y esterasa-2) (Kashima et al., 1998), en *L. casei* LILA (EstB) (Fenster, et al., 2003).

1.3.7. Lp_3505

L. plantarum WCFS1 presenta en su genoma la proteína Lp_3505 anotada como “acetilesterasa” que no se ha caracterizado. Para hacer un estudio de la actividad esterasa de esta proteína, se amplificó el gen *lp_3505* utilizando los oligonucleótidos 679 y 680 y se clonó en el vector pURI3-TEV mediante la estrategia descrita anteriormente. El plásmido recombinante pURI3-TEV-3505 se propagó en la cepa *E. coli* DH10B y se transfirió a la cepa *E. coli* BL21 (DE3) para la hiperproducción de la proteína recombinante. En este caso también se necesitó la presencia de chaperonas para hiperproducir la proteína soluble. La proteína se eluyó de la resina de afinidad con pH ácido (Tampón McIlvaine 150 mM pH 5). Posteriormente, se realizó una electroforesis en geles SDS-PAGE de acrilamida para comprobar la pureza de la enzima purificada.

Como se observa en la Figura 25, tanto en el extracto soluble procedente de las células de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con el plásmido pURI3-TEV-3505 como en las fracciones eluidas aparecen las bandas correspondientes a la hiperproducción de la proteína Lp_3505 con un peso molecular aproximado de 31 kDa (30,14 kDa calculado). Mediante el procedimiento descrito se obtuvieron 15 mg de enzima esterasa por litro de cultivo

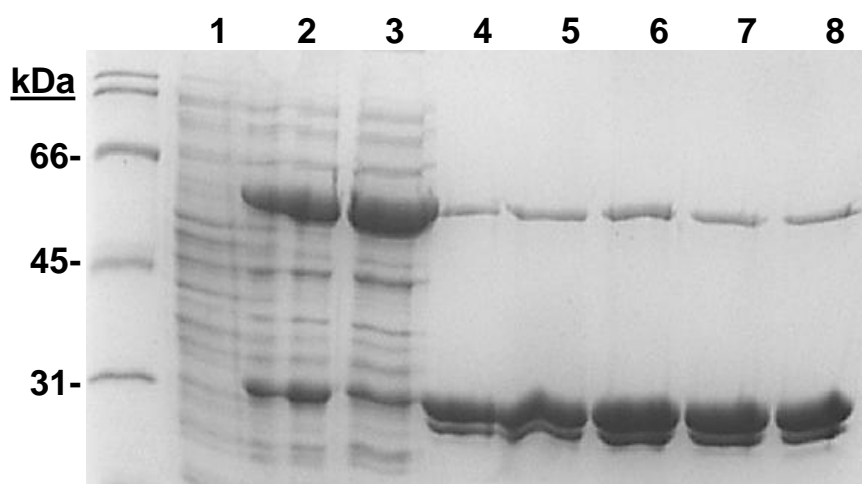


Figura 25. Hiperproducción y purificación de la proteína Lp_3505 recombinante de *L. plantarum* WCFS1. 1, extracto proteico soluble procedente de células inducidas con IPTG *E. coli* BL21 (DE3) (pURI3-TEV); 2, extracto proteico soluble de células *E. coli* BL21 (DE3) (pURI3-TEV-3505); 3, fracción eluída no retenida en la resina de afinidad; 4-8 fracciones eluídas de la columna de afinidad con imidazol (150 mM). Gel SDS-PAGE 12,5% de acrilamida. El marcador de peso molecular *Broad-Range* (Bio-Rad), está representado a la izquierda.

Se analizó la especificidad de sustrato frente a ésteres derivados de *p*-NF de distinta longitud de la cadena acilo (C2-C16). Como se observa en la Figura 26A, Lp_3505 presentó mayor actividad sobre acetato de *p*-nitrofenilo, pero también hidrolizo en menor medida butirato de *p*-nitrofenilo, octanoato de *p*-nitrofenilo, miristato de *p*-nitrofenilo y palmitato de *p*-nitrofenilo. Por lo tanto, la enzima Lp_3505 es una esterasa.

Dado que la enzima presentó una elevada actividad sobre acetato de *p*-nitrofenilo y está anotada como acetilesterasa, se decidió comprobar si actuaba sobre otros ésteres de acetato, entre ellos acetato de fenilo. Para ello se utilizó una librería de ésteres que presenta entre otros distintos ésteres de acetato. Curiosamente, los sustratos sobre los que actuó fueron ésteres de acetato, siendo el acetato de fenilo el que hidrolizó más eficazmente. Lp_3505 hidrolizó ésteres como el trifluoroacetato de etilo, bromoacetato de etilo, trimetil acetato de vinilo, bromoacetato de metilo, hidroxiacetato de metilo, acetato de propilo, acetato de butilo, acetato de isopropenilo, acetato de isobutilo y triacetina. De los ésteres de acetato analizados, únicamente no hidrolizó acetato de etilo, acetato de vinilo y acetato de metilfenilo. Con estos resultados parece que Lp_3505 mostró preferencia por ésteres de acetato independientemente del

grupo alcohol y de la presencia de electrones desapareados en la parte acilo (trifluoroacetato de etilo, bromoacetato de etilo, glicinato de etilo, bromoacetato de metilo e hidroxiacetato de metilo) (Figura 26B). En base a este rango de sustratos observado, se podría clasificar a Lp_3505 como una acetilesterasa. Previamente se ha descrito una acetilesterasa de *L. plantarum* purificada de extractos celulares (Otherholm et al., 1972). Dicha acetilesterasa presentó una elevada preferencia por ésteres de acetilo, sin embargo, contrariamente a Lp_3505 no hidrolizó ésteres alifáticos incluyendo aquellos de acetato (Otherholm et al., 1972). Ambas acetilesterasas mostraron menos actividad enzimática conforme aumenta la longitud del ácido graso de los tricéridos. La actividad frente a triacetina fue mucho mayor que sobre tributirina. Lp_3505 además presentó actividad arilesterasa en tanto en cuanto hidrolizó también acetato de fenilo, al igual que las esterasas Lp_0973, Lp_1002 y Lp_2631 de *L. plantarum* WCFS1 descritas en este trabajo.

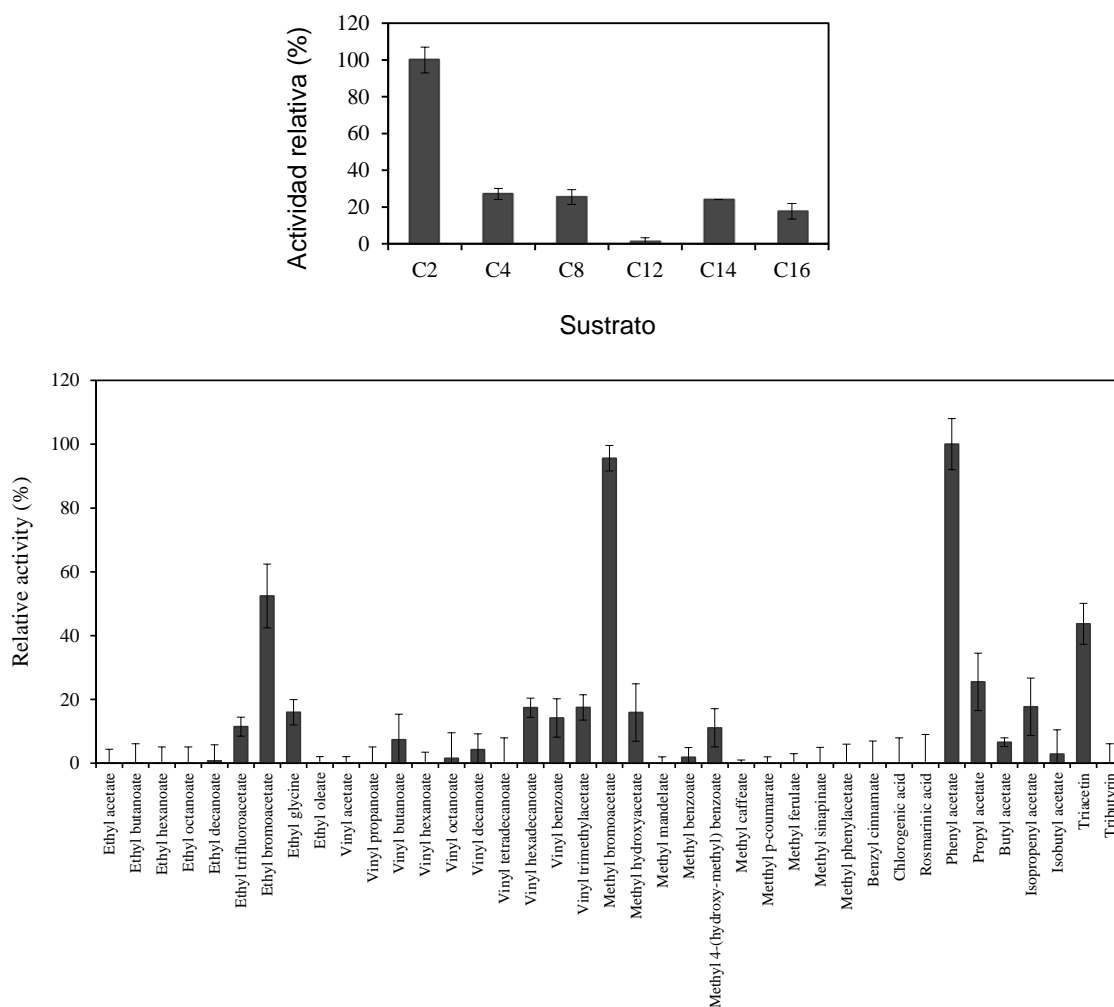


Figura 25. Especificidad de sustrato de Lp_3505 frente a (A) sustratos cromogénicos (ésteres de *p*-nitrofenilo) con diferente longitud de la cadena acilo (C₂, acetato; C₄, butirato; C₈, caprilato; C₁₂, laurato; C₁₄, miristato; C₁₆, palmitato) o (B) hacia una librería general de ésteres. Se representa la actividad relativa obtenida con los diferentes sustratos. Las barras de error representan la desviación estándar estimada de tres ensayos independientes. La máxima actividad obtenida se definió como el 100%.

1.3.8. Lp_3561

Para hiperproducir y purificar la proteína Lp_3561 se clonó el gen *lp_3561* en el vector pURI3-TEV (oligonucleótidos 573 y 574), pero la proteína no se hiperprodujo eficazmente. Para ello, se clonó el gen *lp_3561* de la cepa *L. plantarum* WCFS1 en el vector pURI3-Cter (Curiel et al., 2011), utilizando los oligonucleótidos 957 y 958. El plásmido recombinante pURI3-Cter-3561 se propagó en la cepa *E. coli* DH10B y una vez verificada su secuencia, se

transfirió a la cepa *E. coli* BL21 (DE3) para la hiperproducción de la proteína recombinante que finalmente se consiguió hiperproducir la proteína en forma soluble en presencia de de chaperonas. La proteína se hiperprodujo en las condiciones habituales, se purificó utilizando imidazol 150 mM para eluir la proteína y posteriormente se dializó. Una vez purificada la enzima, se realizó una electroforesis en geles SDS-PAGE y se observó que tanto en el extracto soluble procedente de las células de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con los plásmidos pURI3-Cter-3561 y pGRO7 como en las fracciones eluidas aparecen las bandas correspondientes a la hiperproducción de la proteína Lp_3561 con un peso molecular aproximado de 31 kDa. Se obtuvieron 21,5 mg de esterasa Lp_3561 por litro de cultivo.

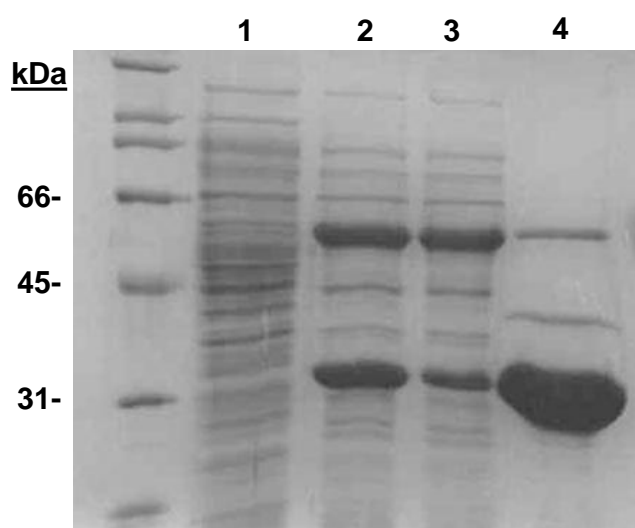


Figura 27. Hiperproducción y purificación de la proteína Lp_3561 recombinante de *L. plantarum* WCFS1. 1, extracto proteico soluble procedente de células inducidas con IPTG *E. coli* BL21 (DE3) (pURI3-Cter); 2, extracto proteico soluble de células *E. coli* BL21 (DE3) (pURI3-Cter-3561) (pGRO7); 3, fracción eluída no retenida en la resina de afinidad; 4-8 fracciones eluidas de la columna de afinidad con imidazol (150 mM). Gel SDS-PAGE 12,5% de acrilamida. El marcador de peso molecular *Broad-Range* (Bio-Rad), está representado a la izquierda.

Una vez purificada la enzima Lp_3561 de *L. plantarum* WCFS1 se estudió su especificidad de sustrato. La esterasa Lp_3561 fue muy selectiva sobre ésteres de cadena acilo corta, principalmente acetato de *p*-nitrofenilo (C2), aunque también hidrolizó butirato de *p*-nitrofenilo (20%) no hidrolizando el resto de sustratos analizados (Figura 28A). Lp_3561 presentó una elevada

especificidad por pNPA, al igual que la proteína Lp_1002 descrita en este trabajo. Con respecto a los resultados de la librería de ésteres comerciales, como se observa en la Figura 28B, Lp_3561 hidrolizó eficazmente acetato de fenilo, lo que indica que presenta actividad arilesterasa, con una especificidad selectiva por ésteres con el grupo alcohol aromático.

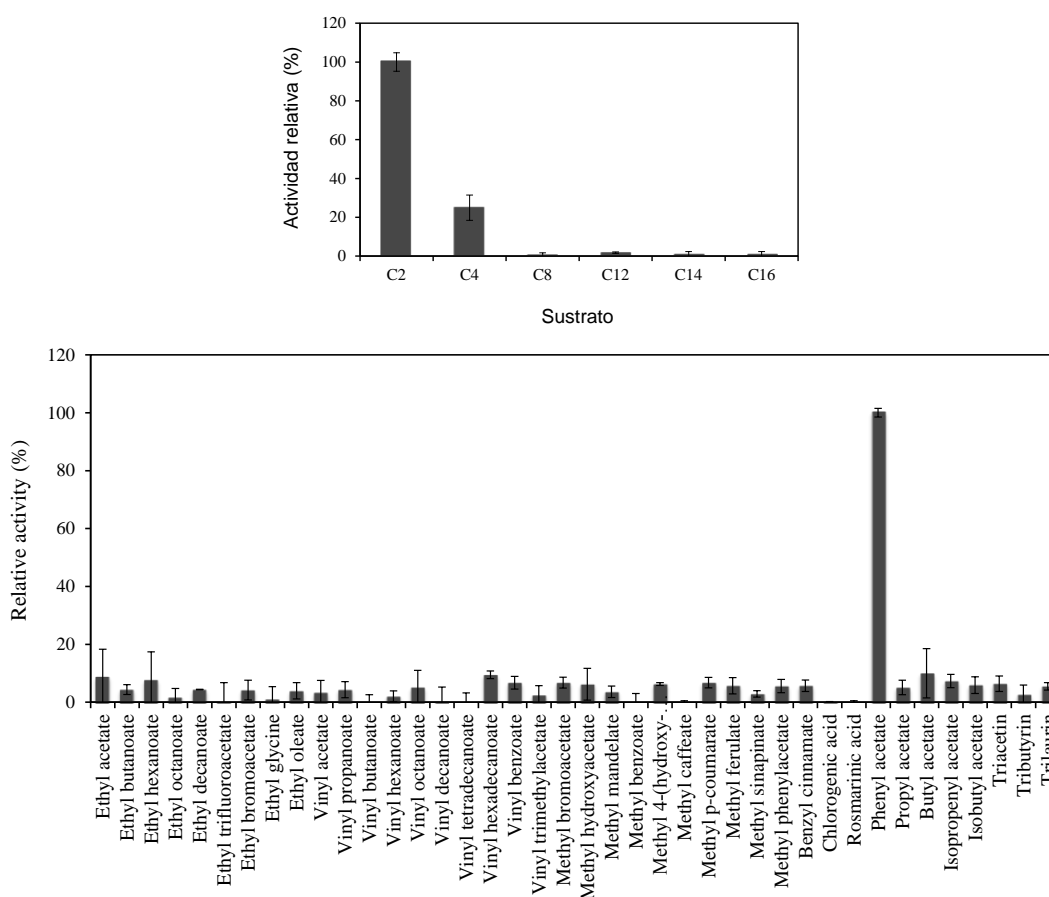


Figura 28. Especificidad de sustrato de Lp_3561 frente a (A) sustratos cromogénicos (ésteres de *p*-nitrofenilo) con diferente longitud de la cadena acilo (C₂, acetato; C₄, butirato; C₈, caprilato; C₁₂, laurato; C₁₄, miristato; C₁₆, palmitato) o (B) hacia una librería general de ésteres. Se representa la actividad relativa obtenida con los diferentes sustratos. Las barras de error representan la desviación estándar estimada de tres ensayos independientes. La máxima actividad obtenida se definió como el 100%.

Esto indicaría que Lp_3561 presenta un bolsillo de unión del grupo alcohol que puede albergar estructuras planares grandes, al igual que otras arilesterasas microbianas descritas previamente (Fenster et al., 2000; Kashima et al., 1998; Fenster et al., 2003; Fenster et al., 2003; Fenster et al., 2003;

Navarro-González et al., 2012). Aunque menos eficazmente que la arilesterasa Lp_1002 de *L. plantarum* WCFS1, Lp_3561 presentó actividad residual sobre la mayoría de sustratos ensayados.

1.3.9. Lp_3562

La última proteína anotada como esterasa (lipasa/esterasa) en el genoma de *L. plantarum* WCFS1 es Lp_3562. Con objeto de conocer la actividad de esta proteína, se decidió hiperproducir y purificar la proteína Lp_3562 recombinante. Para ello, se clonó el gen *lp_3562* en el vector pURI3-TEV, utilizando los oligonucleótidos 575 y 576 mediante una estrategia de clonación descrita previamente. El plásmido recombinante pURI3-TEV-3562 se propagó en la cepa *E. coli* DH10B y una vez verificada su secuencia, se transfirió a la cepa *E. coli* BL21 (DE3) para la hiperproducción de la proteína recombinante. Una vez observado que la proteína se hiperproducía eficazmente en presencia de chaperonas (GroEL/GroES), se purificó la proteína recombinante y se eluyó utilizando imidazol 150 mM. Posteriormente se comprobó la adecuada hiperproducción de la enzima (30 kDa) mediante análisis SDS-PAGE (Figura 29). Se obtuvieron 25 mg de enzima esterasa por litro de cultivo.

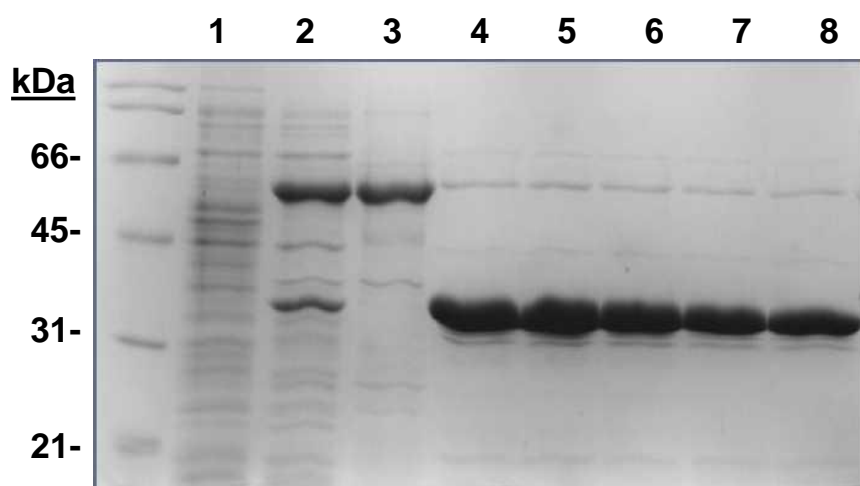


Figura 29. Hiperproducción y purificación de la proteína Lp_3562 recombinante de *L. plantarum* WCFS1. 1, extracto proteico soluble procedente de células inducidas con IPTG *E. coli* BL21 (DE3) (pURI3-TEV); 2, extracto proteico soluble de células *E. coli* BL21 (DE3) (pURI3-TEV-3562) (pGRO7); 3, fracción eluída no retenida en la resina de afinidad; 4-8 fracciones eluídas de la columna de afinidad con imidazol (150 mM). Gel SDS-PAGE 12,5% de acrilamida. El marcador de peso molecular *Broad-Range* (Bio-Rad), está representado a la izquierda.

Posteriormente, se analizó la especificidad de sustrato de la enzima. La esterasa Lp_3562 fue activa sobre todos los sustratos ensayados, presentado máxima actividad sobre los ésteres de longitud de cadena acilo C2 y C14 (Figura 30A). Estos resultados sugieren que Lp_3562 es una lipasa. Para comprobarlo, se estudió la actividad frente a varios ésteres entre los que se incluyen sustratos típicos de lipasas como los triglicéridos. Como se observa en la Figura 30B, Lp_3562 fue incapaz de hidrolizar la mayoría de los sustratos probados. Sin embargo, Lp_3562 hidrolizó eficazmente tributirina aunque también hidrolizó en menor medida acetato de fenilo, trilaurina, acetato de butilo, acetato de etilo y glicolato de metilo. Por lo tanto, estos resultados confirman la actividad lipasa de Lp_3562. La tributirina es un compuesto habitual utilizado para identificar actividad lipasa, por lo tanto estos resultados demuestran que Lp_3562 es una lipasa, al igual que Lp_1760. Previamente, se han purificado parcialmente tributirin esterasas de *L. plantarum* (Andersen et al., 1995; Gobetti et al., 1996; Gobetti et al., 1997; (Lopes Mde, et al., 2002), sin embargo, ninguna de ellas ha sido identificada genéticamente.

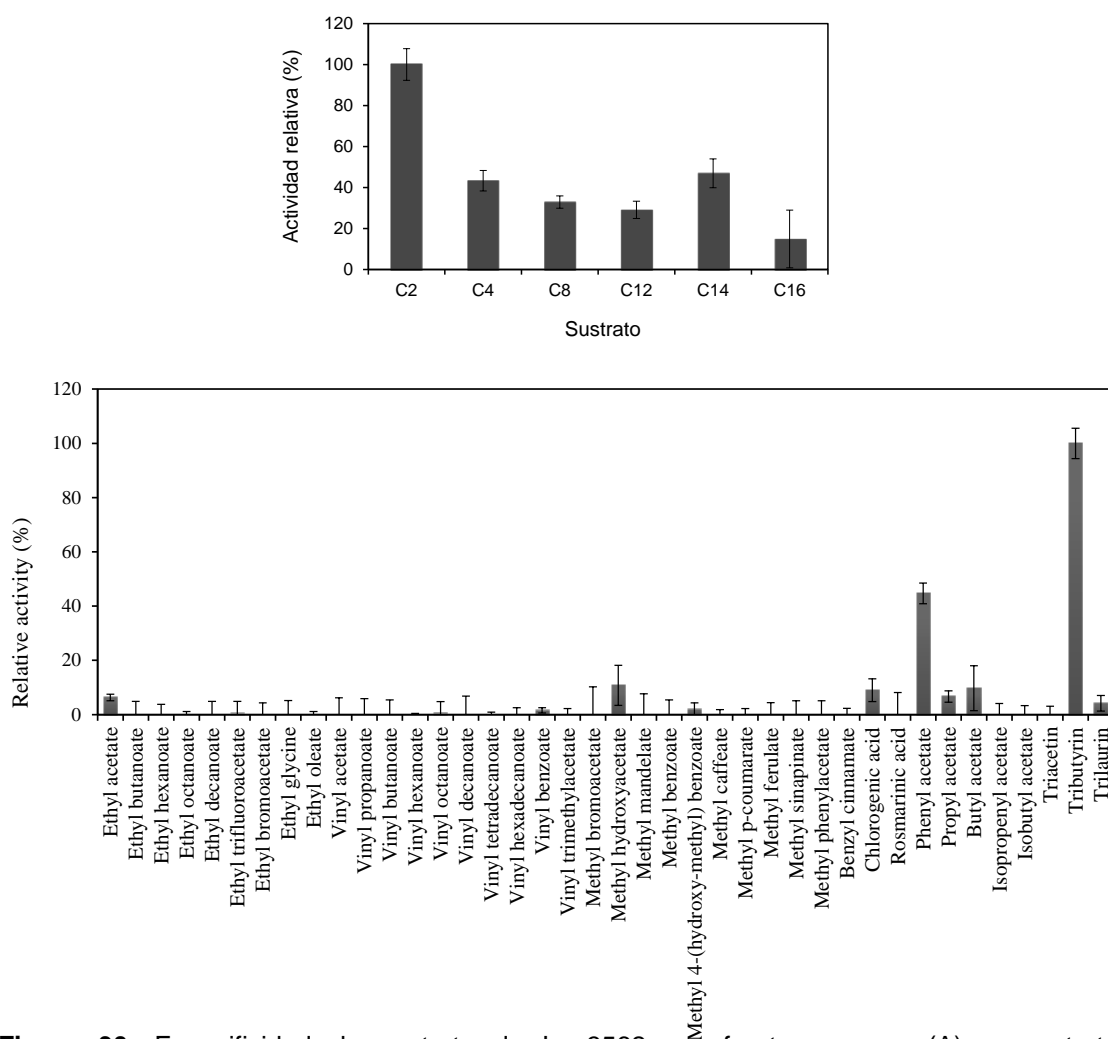


Figura 30. Especificidad de sustrato de Lp_3562 frente a (A) sustratos cromogénicos (ésteres de *p*-nitrofenilo) con diferente longitud de la cadena acilo (C₂, acetato; C₄, butirato; C₈, caprilato; C₁₂, laurato; C₁₄, miristato; C₁₆, palmitato) o (B) hacia una librería general de ésteres. Se representa la actividad relativa obtenida con los diferentes sustratos. Las barras de error representan la desviación estándar estimada de tres ensayos independientes. La máxima actividad obtenida se definió como el 100%.

1.4. Esterasas de ésteres fenólicos en *L. plantarum* WCFS1

Las hidrolasas de ésteres carboxílicos (EC 3.1.1.x) (esterasas) representan un grupo muy diverso de hidrolasas que actúan sobre enlaces éster. Entre estas enzimas, se pueden distinguir carboxilesterasas (EC 3.1.1.1), arilesterasas (EC3.1.1.2), lipasas (EC 3.1.1.3) o feruloil esterazas (EC 3.1.1.73) (Silva Lopes Mde, et al., 1999). Las carboxilesterasas y las arilesterasas catalizan típicamente la hidrólisis de ésteres alifáticos de cadena corta o media

solubles en agua, mientras que las lipasas presentan actividad frente a ésteres de cadena larga e insolubles en agua (Bornscheuer 2002). Las arilesterasas se distinguen por su preferencia por ésteres aromáticos, al igual que las feruloil esterases, que actúan específicamente sobre ésteres de ácidos hidroxycinámicos.

En esta tesis se ha analizado el rangol de sustratos que hidrolizan algunas de las proteínas anotadas como esterases en el genoma de *L. plantarum* WCFS1. El estudio de la especificidad de sustrato utilizando derivados de *p*-nitrofenilo de distinta longitud de cadena acilo fue la primera aproximación que se utilizó para ver la preferencia de las esterases en función de la longitud de la cadena acilo. En base a los resultados obtenidos, se puede hacer una clasificación inicial de estas proteínas entre verdaderas esterases (Lp_0796, Lp_0973, Lp_1002, Lp_2631, Lp_2923, Lp_3505 y Lp_3561) y lipasas (Lp_1760 y Lp_3562). Aunque todas ellas hidrolizaron preferencialmente ésteres de cadena corta (C2 y C4), sin embargo las proteínas Lp_1760 y Lp_3562 hidrolizaron además eficazmente ésteres de cadena acilo larga (C14 y C16), lo que indicaría que presentan actividad lipasa. Una vez realizada esta primera clasificación y para conocer el rango de sustratos sobre el que actúan las esterases, se utilizó una librería de 48 ésteres entre los que se encuentran ésteres aromáticos, para identificar enzimas con actividad arilesterasa o feruloil esterasa. En la actualidad, no se ha descrito ninguna enzima en *L. plantarum* que presente esta actividad y tienen gran importancia puesto que están implicadas en el metabolismo de compuestos fenólicos.

Como se observa en la Tabla 6, de las 9 esterases estudiadas, en función del rango de sustratos que hidrolizan, todas presentan actividad sobre ésteres aromáticos (acetato de fenilo) y concretamente la proteína Lp_0796 es una feruloil esterasa. Además, se han identificado dos lipasas (Lp_1760 y Lp_3562).

Tabla 6. Especificidad de sustrato de las esterasas de *L. plantarum* WCFS1

Especificidad de sustrato	Esterasas de <i>L. plantarum</i> WCFS1								
	Lp_0796 ^a	Lp_0973 ^b	Lp_1002 ^c	Lp_1760 ^d	Lp_2631	Lp_2923	Lp_3505	Lp_3561 ^e	Lp_3562
Arilesterasa (acetato de fenilo)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Feruloil esterasa (<i>p</i> -cumarato de metilo, cafeato de metilo, ferulato de metilo, sinapinato de metilo)	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Tanasa (galato de metilo y									
3,4-dihidroxibenzoato de etilo)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lipasa (tributirina, trilaurina)	-	+/-	-	+	-	-	-	-	+
	BRE, BRM	BRE	ACE, OCV				ésteres de acetato		
Esterasa (ésteres alifáticos)	PRV	ACI	TDV	HAM	-	ACI	HDV, ACB	HAM, ACB	

^a BRE, bromoacetato de etilo; BRM bromoacetato de metilo; PRV, propanoato de vinilo

^b ACI, acetato de isopropanilo

^c ACE, acetato de etilo; OCV, octanoato de vinilo; TDV, tetradecanoato de vinilo

^d HAM, hidroxacetato de metilo

^e HDV, hexadecanoato de vinilo; ACB, acetato de butilo

1.4.1. Identificación y caracterización bioquímica de arilesterasas

Las nueve proteínas de *L. plantarum* WCFS1 analizadas presentaron actividad arilesterasa, ya que hidrolizaron el acetato de fenilo que es el sustrato modelo para identificar arilesterasas {Wang, 2010 #83}. Entre las esterasas, las arilesterasas presentan gran interés biotecnológico ya que no sólo actúan sobre ésteres alifáticos, sino también sobre ésteres aromáticos, por lo que modulan el perfil de ésteres de los alimentos. Las enzimas arilesterasas se han estudiado menos que otros tipos de esterasas, especialmente carboxilesterasas o lipasas (Park et al., 2008). En la actualidad se han descrito pocas arilesterasas bacteriana cuya función fisiológica permanece desconocida. Se han descrito arilesterasas de *Vibrio mimicus* (Shaw et al., 1994), *Agrobacterium radiobacter* (Sakai et al., 1998), *Acinetobacter* sp. (Jones et al., 1999), *Pseudomonas fluorescens* (Cheeseman et al., 2004), *Sulfolobus solfataricus* (Park et al., 2008) y *G. oxydans* (Navarro-Gonzalez, et al., 2012). Entre las bacterias lácticas, únicamente se han descrito arilesterasas de *Lactobacillus helveticus* (Fenster et al., 2000), y *Lactobacillus casei* (Fenster et al., 2003). Por lo tanto, las proteínas estudiadas en esta tesis son las primeras

arilesterasas descritas en *L. plantarum* y más concretamente en una bacteria láctica modelo en fermentaciones de sustratos vegetales. Las arilesterasas bacterianas se pueden utilizar con fines industriales, especialmente si se considera el hecho de que presentan una amplia especificidad de sustrato {Wang, 2010 #83}. Las proteínas Lp_1760 y Lp_3562, a pesar de que presentaron actividad arilesterasa, se han considerado lipasas porque hidrolizaron triglicéridos más eficazmente que acetato de fenilo. Estos resultados junto con los obtenidos con los derivados de *p*-nitrofenilo confirman la actividad lipasa de estas dos proteínas, definiéndose la actividad esterasa como aquellas esterasas que actúan sobre triglicéridos y ésteres de cadena larga e insolubles en agua. La tributirina es una grasa, siendo el triglicérido más simple presente en grasas naturales y aceites. Los triglicéridos son los lípidos principales presentes en alimentos (Collins et al., 2003). Los triglicéridos son ésteres de glicerol formados por un esqueleto de glicerol con tres ácidos grasos esterificados. En *L. plantarum* se han purificado parcialmente algunas lipasas (Anderson et al., 1995; Gobbetti et al., 1996; Gobbetti et al., 1997; (Lopes Mde, et al., 2002), pero no se han identificado genéticamente. Por lo tanto, las lipasas Lp_1769 y Lp_3562 son las primeras lipasas identificadas genéticamente en *L. plantarum*.

Dada la importancia de las enzimas arilesterasas y teniendo en cuenta que son enzimas útiles en la industria alimentaria, se estudiaron sus propiedades bioquímicas más importantes, entre las que se incluye la temperatura y pH óptimos, su estabilidad térmica, sus constantes cinéticas, así como el efecto de aditivos. Se ensayó la actividad enzimática en un rango de valores de pH de 3 a 9 y en el rango de temperaturas de 5 °C a 65 °C. En las enzimas esterasas es interesante analizar el efecto de detergentes así como el efecto de solventes orgánicos para comprobar la potencialidad de cada enzima para utilizarse como catalizador en medios no-acuosos. También se analizó el efecto de agentes reductores e inhibidores, así como de iones metálicos, ya que aunque estas enzimas no requieren cofactores (Bornscheuer 2002), la actividad puede incrementar en presencia de dichos compuestos. Por ello se estudió el efecto de varios iones (K^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Ca^{2+} , Hg^{2+} , Zn^{2+}), detergentes (Tween 20, Tween 80, Tritón X-100, SDS), agentes quelantes (EDTA), agentes reductores (cisteína, DTT y β -mercaptoetanol), agentes

desnaturalizantes (urea), solventes orgánicos (DMSO) e inhibidores (EDTA, DEPC, PMSF) en la actividad enzimática de las esterasas de ésteres aromáticos.

La caracterización bioquímica de estas proteínas permitirá conocer aquellas esterasas que por sus características cinéticas y bioquímicas sean más adecuadas para procesos tecnológicos concretos de elaboración de productos alimentarios.

Considerando el rango de sustratos que hidrolizaron las enzimas, se decidió clasificarlas de la siguiente forma: La proteína Lp_0796 como feruloil esterasa, las proteínas Lp_0973, Lp_1002, Lp_2631, Lp_2923, Lp_3505 y Lp_3561 como arilesterasas y las proteínas Lp_1760 y Lp_3562 como lipasas. Por ello, a pesar de que las lipasas presentan muchas aplicaciones biotecnológicas e influyen en la elaboración de productos fermentados como por ejemplo en productos cárnicos y lácteos, en esta tesis no se ha incluido su caracterización bioquímica ya que el objetivo de la misma es estudiar las enzimas implicadas en el metabolismo de ésteres aromáticos.

1.4.1.1. Lp_0973

Una vez observado que Lp_0973 es una esterasa con actividad arilesterasa, se determinaron sus características bioquímicas más relevantes utilizando acetato de *p*-nitrofenilo como sustrato. La enzima Lp_0973 presentó una actividad específica de 4.7×10^3 U/mg.

La esterasa Lp_0973 recombinante de *L. plantarum* WCFS1 presentó un máximo de actividad a pH 6.5 (Figura 31A), aunque también presenta una elevada actividad entre pH 5.0 y 7.0. Con respecto a la temperatura (Figura 31B), la actividad máxima se obtuvo a 30 °C, a 20°C la actividad fue el 80% y a 37% la actividad fue elevada (50%). Estos valores de pH y temperatura presentados por Lp_0973 son frecuentes en otras esterasas de bacterias lácticas como la esterasa intracelular EstC de *Lactobacillus casei* LILA, una lipasa intracelular y una tributirín esterasa de *L. plantarum* 2739 (Fenster, et al., 2003); Gobbetti et al., 1996b; Gobbetti et al., 1997). Estos resultados de

actividad en función del pH coinciden con los obtenidos previamente en esta enzima por Brod *et al.* (2010), ya que en sus estudios la enzima presentó un pH óptimo de 6,0-6,5. Sin embargo la esterasa caracterizada previamente, presentó la actividad óptima a 40 °C. Aunque este resultado discrepa con el obtenido en este trabajo, estos autores describieron que la temperatura óptima de la enzima Lp_0973 hiperproducida en extractos celulares de *E. coli* fue de 30 °C que es la que se ha obtenido en este trabajo (Kolling, et al., 2011).

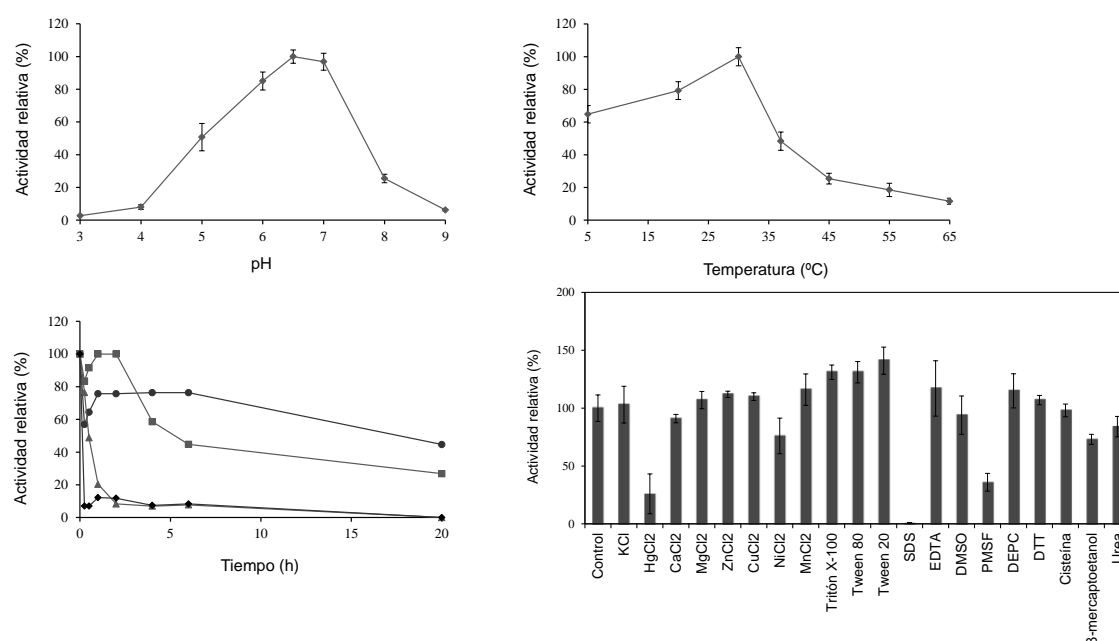


Figura 31. Caracterización bioquímica de la arilesterasa Lp_0973 de *L. plantarum* WCFS1. (A) Efecto del pH en la actividad (las reacciones con la enzima se llevaron a cabo en un rango de pH entre 3.0 y 9.0). (B) Efecto de la temperatura en la actividad (las reacciones se incubaron en un intervalo de temperatura entre 5 y 65 °C). (C) Estabilidad térmica. La enzima se incubó a 25 °C (□), 30 °C (○), 37 °C (△) y 45 °C (◇) en tampón fosfato 50 mM pH 7.0. (D) Efecto de distintos aditivos (concentración final 1 mM) en la actividad enzimática. Los experimentos se realizaron por triplicado. Se representa la media y la desviación estándar. La máxima actividad observada se consideró el 100% de actividad.

En el trabajo realizado previamente por (Brod, et al., 2010) no se había estudiado la termoestabilidad de la proteína y este es un aspecto muy importante a tener en cuenta para posibles aplicaciones industriales. Lp_0973 mantuvo la actividad en incubaciones prolongadas a 22 °C y 30 °C, sin embargo a temperaturas superiores la actividad catalítica de la enzima disminuyó drásticamente. Por lo tanto esta proteína presentó un comportamiento termolábil.

Como se puede observar en la Figura 31D, la actividad de Lp_0973 incrementó en presencia de ZnCl_2 , Tween 20, Tween 80 y Tritón X-100. La activación de esterases con cationes divalentes como ZnCl_2 se ha descrito previamente en una esterasa de *L. casei* subsp. *casei* ifpl731 (Castillo et al., 1999). Otros cationes divalentes como el CaCl_2 no afectaron significativamente a la actividad de la enzima, lo cual coincide con los resultados obtenidos previamente por Brod y colaboradores (Brod, et al., 2010). Iones como el Ni^{2+} y el Hg^{2+} inhibieron la actividad. La completa inhibición de la actividad observada en presencia de Hg^{2+} , se puede deber a la alteración de su grupo tiol, lo que sugeriría que un residuo de cisteína podría estar implicado en el mecanismo catalítico, al igual que le sucede a la esterasa EstI de *L. casei* CL96 (Choi, et al., 2004). La disminución de la actividad enzimática en presencia de estos aditivos también puede deberse a uniones inespecíficas o a la agregación de la enzima.

Lp_0973 se inhibió drásticamente en presencia de SDS y PMSF, presentando una actividad relativa del 14% y el 29% respectivamente. La actividad de la mayoría de esterases de procariotas y eucariotas depende de una triada catalítica formada por los residuos Ser-Asp/Glu-His. Como se observa, DEPC, un modificador de histidina, inhibió parcialmente la actividad, mientras que en presencia de PMSF, un inhibidor específico de la serina catalítica, se inhibió la actividad un 70%. Esto sugiere que una serina y una histidina están implicadas en la actividad del centro activo de la esterasa Lp_0973 de *L. plantarum* WCFS1. Está bien documentado que la serina catalítica se modifica en presencia de PMSF (Choi, et al., 2004). La sensibilidad que presenta Lp_0973 al PMSF fue similar a la que presentaron otras esterases como Est28 de *O. oeni* (Sumby, et al., 2009), EstB de *L. casei* LILA (Fenster, et al., 2003), EstC de *L. casei* LILA (Fenster, et al., 2003), EstA de *L. lactis* MG1363 {Fernández, 2000 #101} y EstI de *L. casei* CL96 (Choi, et al., 2004), entre otras.

1.4.1.2. Lp_1002

Con objeto de conocer si Lp_1002 puede ser una arilesterasa útil en la industria

alimentaria se estudiaron sus propiedades bioquímicas generales. En primer lugar se estudió el efecto del pH y para ello se llevaron a cabo las reacciones a varios valores de pH (3-9) (Figura 32A). Lp_1002 fue activa en el rango de pH de 3 a 8, presentando un rango de pH óptimo de pH 5 a 7. Lp_1002 es la proteína que actúa mejor en condiciones ácidas entre las arilesterasas bacterianas descritas que presentan pH óptimos en el rango de 7 a 9. Sin embargo, se han descrito previamente esterasas de bacterias lácticas que actúan a pH ácido. Las esterasas EstB28 y EstCOo8 de *O. oeni* y EstC34 de *L. hilgardii* presentaron un pH óptimo de 5 (Sumby, et al., 2009) {Sumby, 2013 #90}. Lp_1002 mantiene una actividad significativa (30-40%) a pH 3-4. Es interesante destacar que algunas condiciones en la elaboración de alimentos, como por ejemplo las de vinificación tienen lugar a pH ácido (pH 2.8 a 4.0) {Sumby, 2013 #90}.

Con respecto a la temperatura, la actividad máxima se obtuvo a 40 °C (Figura 32B), sin embargo, a 22 °C Lp_1002 mantuvo un 50% de su actividad máxima. Además, la enzima presentó alta actividad a temperaturas elevadas, ya que a 55°C la actividad relativa fue el 60%. La temperatura óptima que presentó Lp_1002 es similar a la temperatura óptima de las arilesterasas de *G. oxydans* (Navarro-Gonzalez, et al., 2012), *P. fluorescens* (Lui et al., 2010) y *L. helveticus* (Fenster et al., 2000), que son las arilesterasas que presentan mayor similitud de secuencia de aminoácidos con Lp_1002 (grado de indentidad del 16%, 16% y 14 % respectivamente). Además, las esterasas EstB28 y EstCOo8 de *O. oeni*, presentaron su actividad óptima a 40 °C, la misma que Lp_1002 (Sumby, et al., 2009) {Sumby, 2013 #90}.

La actividad arilesterasa de Lp_1002 podría ser importante para modular el perfil de ésteres durante la fermentación de alimentos, ya que los ésteres deben encontrarse en unos niveles adecuados, los cuales contribuyen sinérgicamente en el aroma de dichos alimentos, como por ejemplo el vino (Sumby et al., 2010).

Respecto a la termoestabilidad de la proteína, se comprobó que la arilesterasa Lp_1002 es bastante estable a temperaturas iguales o inferiores a

45 °C, ya que mantuvo el 70% de actividad residual tras 20 h de incubación (Figura 32C).

Además, se estudió el efecto de distintos iones metálicos y aditivos sobre la actividad enzimática de Lp_1002 (Figura D). Como se puede observar, la actividad se inhibió significativamente en presencia de los iones Hg^{2+} , Cu^{2+} y Ni^{2+} , así como también por β -mercaptoetanol y el inhibidor PMSF. Esto indicaría que la serina del centro activo está implicada en la actividad catalítica de Lp_1002. Una arilesterasa aislada del rúmen de cabra también se inhibió en presencia de estos cationes (Wang et al., 2011). Sin embargo, en presencia de CaCl_2 y MnCl_2 la actividad incrementó ligeramente (25-30%). Una tributirín esterasa de *L. plantarum* 2739 (Gobbetti et al., 1997) también incrementa moderadamente su actividad en presencia de Ca^{2+} . Detergentes como el Tritón X-100, Tween 20 y Tween 80 incrementaron también la actividad enzimática de Lp_1002, aunque otros detergentes como el SDS inhibieron la actividad un 70%.

Este incremento de actividad enzimática observado por detergentes no iónicos y la inhibición por detergentes iónicos se han descrito previamente para arilesterasa aislada del rumen de cabra (Wang et al., 2011). La presencia de estos detergentes en bajas concentraciones, probablemente despliega parcialmente la enzima y puede incrementar la actividad de la enzima. Alternativamente, el efecto activador de estos detergentes se puede asociar con un replegamiento parcial de proteínas recombinantes mal plegadas {Wang, 2010 #83}.

Resultados y Discusión

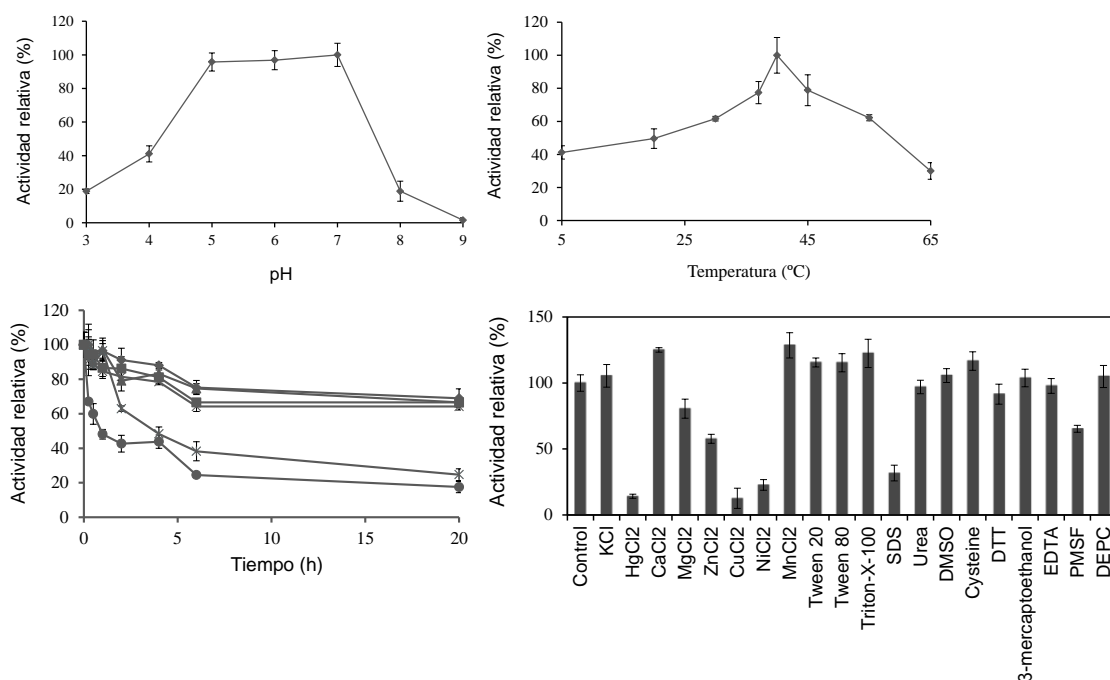


Figura 32. Caracterización de la arilesterasa Lp_1002 de *L. plantarum* WCFS1. (A) Efecto del pH en la actividad (las reacciones con la enzima se llevaron a cabo en un rango de pH entre 3.0 y 9.0). (B) Efecto de la temperatura en la actividad (las reacciones se incubaron en un intervalo de temperatura entre 5 y 65 °C). (C) Estabilidad térmica. La enzima se incubó a 25 °C (círculos), 30 °C (cuadrados), 37 °C (triángulos) y 45 °C (rombos), 55 °C (asterisco) y 65 °C (aspas). (D) Efecto de diferentes aditivos en la actividad enzimática. Los experimentos se realizaron por triplicado. Se representa la media y la desviación estándar. La máxima actividad observada se consideró el 100% de actividad.

1.4.1.3. Lp_2631

La arilesterasa Lp_2631 presentó una actividad específica de 185,84 U/mg. Aunque la enzima Lp_2631 mostró actividad desde pH 3,0 a pH 8,0 (Figura 33A), la máxima actividad se observó a pH 6,5. Este pH óptimo se ha descrito en otras esterases de *L. plantarum* (Gobbetti et al., 1996; Gobbetti et al., 1997), así como también en una arilesterasa de *G. oxidans* (Navarro-Gonzalez, et al., 2012). Además se estudió el efecto de la temperatura sobre la actividad de la esterase Lp_2631 (Fig. 33B). Curiosamente, la actividad máxima se observó a 20 °C y mostró más del 90% de actividad a 5 °C. La actividad descendió un 70-80% a temperaturas superiores. Estas condiciones de temperatura de Lp_2631 sugieren que esta enzima podría ser una esterase adaptada al frío, siendo la primera esterase con una elevada actividad a bajas temperaturas descrita en bacterias lácticas. Se ha descrito un comportamiento

similar a Lp_2631 en esterasas adaptadas al frío de otras bacterias o aisladas de librerías metagenómicas. EstB de *Alcalinovorax dieselolei* B-5(T) presentó la temperatura óptima alrededor de 20 °C y mantuvo más del 95% de actividad entre 0 y 10 °C sugiriendo su adaptación al frío (Zhang, Wu, Liu, Shao, & Liu, 2013). La esterasa EML1 obtenida de una librería metagenómica de sedimentos marinos mantuvo más del 50% de actividad a 5 °C con una temperatura óptima de 25 °C, o una esterasa producida por *Psychrobacter cryohalolentis* K5 que presentó una actividad óptima a 35 °C y conserva más del 90% de su actividad máxima a 0-5 °C (Novototskaya-Vlasova et al., 2012).

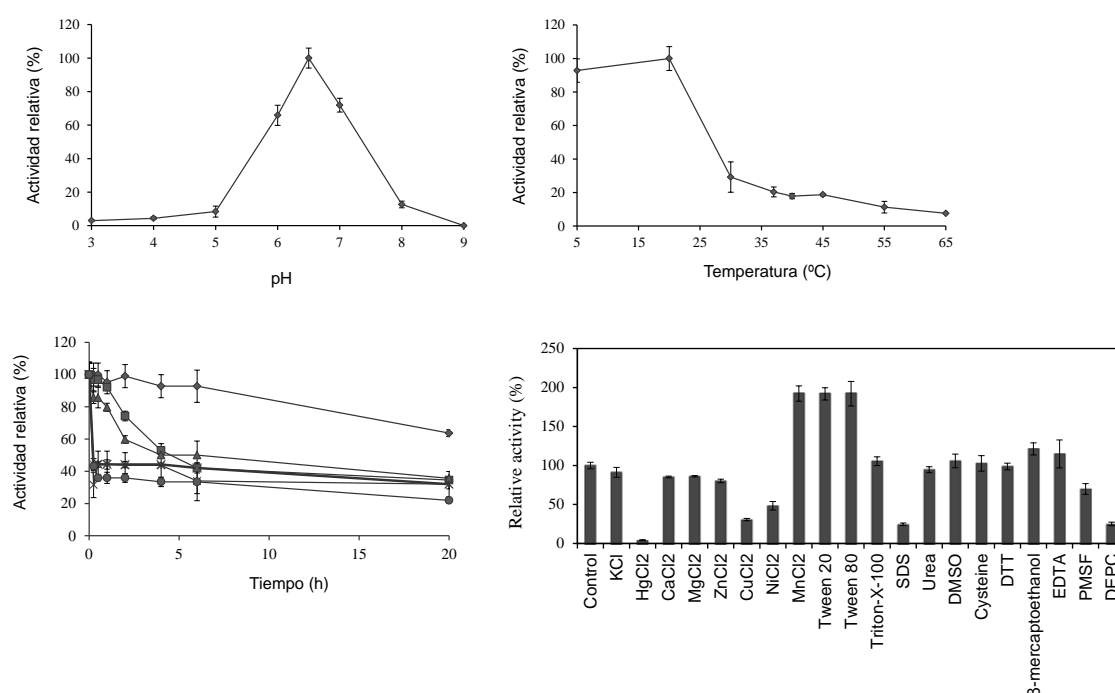


Figura 33. Caracterización de la arilesterasa Lp_2631 de *L. plantarum* WCFS1. (A) Efecto del pH en la actividad (las reacciones con la enzima se llevaron a cabo en un rango de pH entre 3.0 y 9.0). (B) Efecto de la temperatura en la actividad (las reacciones se incubaron en un intervalo de temperatura entre 5 y 65 °C). Estabilidad térmica. La enzima se incubó a 25 °C (círculos), 30 °C (cuadrados), 37 °C (triángulos) y 45 °C (rombos) en tampón fosfato 50 mM pH 7.0. (D) Efecto de diferentes aditivos en la actividad enzimática. Los experimentos se realizaron por triplicado. Se representa la media y la desviación estándar. La máxima actividad observada se consideró el 100% de actividad.

Se ha descrito que las esterasas adaptadas al frío presentan unas características comunes comparadas con las esterasas de organismo mesófilos o termófilos como un bajo ratio de Arg/(Arg+Lys), una baja proporción de residuos de prolina y una elevada proporción de residuos

pequeños (Gly y Ala). Cuando se analizó la secuencia de aminoácidos de la esterasa Lp_2631, se observó un ratio Arg/(Arg+Lys) de 0,45, menor que el de otras esterasas adaptadas al frío (Wu et al., 2013; Fu et al., 2013). Además, el porcentaje total de residuos pequeños (20,31%), el porcentaje de Gly (7,28%) y Ala (13,03%) es relativamente alto comparado con la baja proporción de Arg (3,45%) y Pro (5,75%). Estas características junto con la elevada actividad a temperaturas de refrigeración confirman que Lp_2631 puede ser una arilesterasa adaptada al frío.

De manera general, las enzimas adaptadas al frío a menudo se asocian con una baja termoestabilidad, debido a una estabilidad conformacional lábil. Para estudiar la termoestabilidad de Lp_2631, se preincubó a diferentes temperaturas y a distintos tiempos de incubación. Como se observa en la Figura 33D, la esterasa Lp_2631 es estable a 20 °C, ya que mantuvo el 60% de actividad residual tras 20 h de incubación. A 30 °C y 37°C la actividad disminuye progresivamente con el tiempo y tras 4 h de incubación la actividad residual es del 50% y tras 20 h de incubación fue de un 30%. A temperaturas más elevadas mantuvo el 40 % de actividad tras dos horas de incubación a 45-65 °C. La esterasa Lp_2631 no sólo presentó una buena actividad a bajas temperaturas, sino que además mostró una buena termoestabilidad comparada con otras enzimas adaptadas al frío como una lipasa de *Pseudomonas* sp. KB700A (Raschid et al., 2001), o como otra esterasa activa a temperaturas bajas aislada de una librería metagenómica la cual se inactivó rápidamente a temperaturas superiores a 20 °C (Seo et al., 2013).

También se estudió el efecto de varios iones y aditivos sobre la actividad enzimática de la arilesterasa Lp_2631 de *L. plantarum* WCFS1 (Figura 33D). Como se puede observar, detergentes como el Tween 20 y Tween 80 incrementaron la actividad de la enzima aproximadamente un 100%, sin embargo otros detergentes como el SDS inhibieron significativamente la actividad. El incremento de actividad observado en detergentes no iónicos y el descenso por detergente iónicos se ha descrito previamente en esta tesis en las arilesterasas Lp_0973 y Lp_1002 y en la lipasa EML1 adaptada al frío (Jeo et al., 2009) y en una arilesterasa de la familia SGNH aislada del rumen de

cabra EstR5, que mejoró su actividad en presencia de Tween 20, 40 y 80 y Tritón X-100 (Wang et al., 2011). En relación con la presencia de iones metálicos únicamente el Mn^{2+} aumentó la actividad, mientras que Hg^{2+} , Cu^{2+} y Ni^{2+} inhibieron significativamente la actividad (96%, 70% y 50% respectivamente). Esta inhibición por cationes divalentes se ha descrito en otras esterasas de bacterias lácticas como por ejemplo *L. sakei* 23K {Amairi, 2011 #108} y *L. lactis* subsp. *lactis* (Tsakalidou et al., 1992) y podría ser debida a una unión inespecífica o a que estos cationes favorecen la agregación de la enzima. La enzima se inhibió parcialmente en presencia de inhibidores específicos como PMSF y DEPC, por lo que residuos de Ser e His del centro activo parecen estar implicados en la actividad.

1.4.1.4. Lp_2923

Una vez conocida la especificidad de sustrato de la enzima Lp_2923 de *L. plantarum* WCFS1, se determinaron sus características bioquímicas utilizando acetato de *p*-nitrofenilo como sustrato, siguiendo la absorbancia a 348 nm. La proteína presentó una actividad específica de 185,84 U/mg.

La arilesterasa Lp_2923 presentó un pH óptimo de 7,0 (Figura 34A), que es un valor habitual de esterasas o arilesterasas, en comparación con valores de pH más elevados (pH 8,0) presentado por lipasas (Fojan et al., 2000). Lp_2923 también presentó elevada actividad a pH 6,0 y 8,0 (aproximadamente un 80% de la actividad máxima). Con respecto a la temperatura, la actividad máxima se observó a 30 °C, aunque a 45 °C presentó una elevada actividad (aproximadamente un 65% de la actividad máxima). (Figura 34B). Los valores de pH y temperatura óptimos que presenta Lp_2923 son frecuentes en otras esterasas de *Lactobacillus*, como por ejemplo una lipasa intracelular (Gobbetti et al., 1996) y una tributirín esterasa (Gobbetti et al., 1997) de *L. plantarum* y una esterasa intracelular de *L. casei* LILA (Fenster, et al., 2003).

Por otro lado, se comprobó que la arilesterasa Lp_2923 es estable en incubaciones prolongadas hasta 45 °C, ya que mantuvo el 60% de actividad

residual tras 20 h de incubación sin embargo a 55 °C y 65 °C la actividad decayó drásticamente (Figura 34C). Estos resultados se correlacionan con el análisis de la termoestabilidad llevado a cabo mediante espectroscopía de UV-lejano por dicroísmo circular, que reveló una valor aparente de $t_{1/2}$ de 60 °C aproximadamente. Todo ello parece indicar que la arilesterasa Lp_2923 es más termoestable que otras arilesterasas descritas previamente (Navarro-Gonzalez, et al., 2012), así como también las arilesterasas Lp_0973, Lp_1002 y Lp_2631 descritas en esta tesis.

Como se puede observar en la Figura 34D, detergentes como Tween 20, Tween 80 y Tritón X-100 incrementaron la actividad de la enzima. Este efecto también se ha descrito en Lp_0973, Lp_1002 y Lp_2631 y en otras esterases (Wang et al., 2011 SGNH; Park et al., 2008). Sin embargo, detergentes como el SDS ejercieron un efecto desnaturalizante sobre la enzima. En general, la presencia de cationes divalentes mejoró la actividad esterasa, por lo Lp_2923 pudiera ser una arilesterasa dependiente de metales. Sin embargo, cationes como Hg^{2+} y Cu^{2+} inhibieron la actividad, al igual que el inhibidor específico PMSF, indicando que una serina parece estar implicada en la actividad catalítica de la enzima.

1.4.1.5. Lp_3505

Previamente se ha descrito que Lp_3505 presentó actividad sobre numerosos sustratos aunque hidrolizó principalmente ésteres de acetato, entre los que se encuentra el acetato de fenilo, sustrato de arilesterasas {Wang, 2010 #83}. Teniendo en cuenta que las arilesterasas son enzimas muy interesantes y que los ésteres de acetato son muy abundantes en alimentos (cita), se estudiaron las propiedades bioquímicas más relevantes de Lp_3505 utilizando acetato de *p*-nitrofenilo como sustrato. En las condiciones ensayadas, la proteína presentó una actividad específica de 69,46 U/mg.

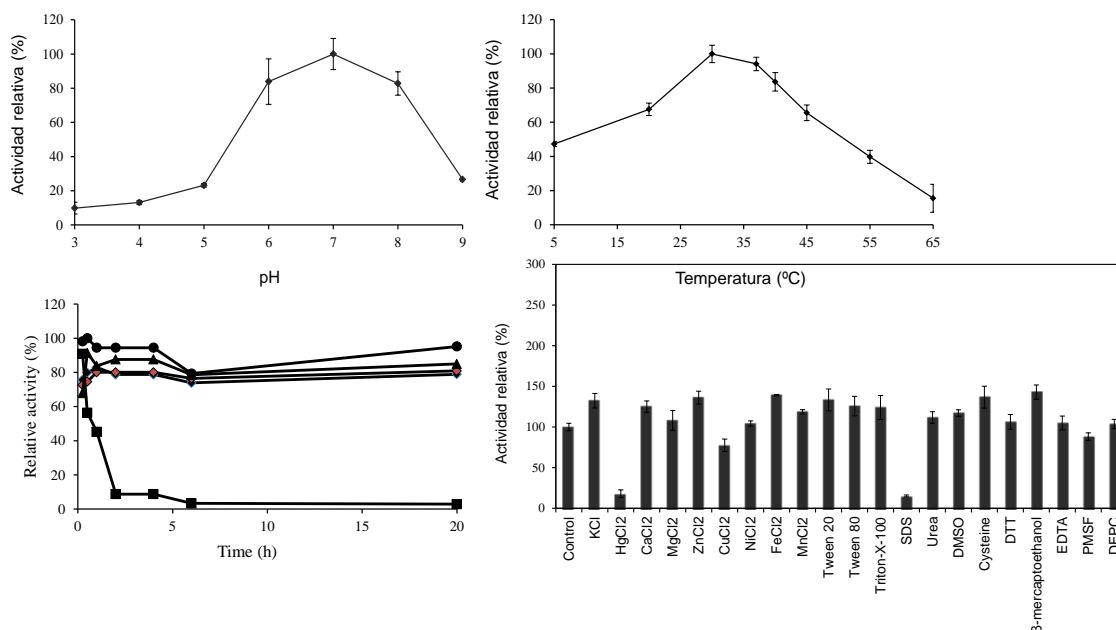


Figura 34. Caracterización de la arilesterasa Lp_2923 de *L. plantarum* WCFS1. (A) Efecto del pH en la actividad (las reacciones con la enzima se llevaron a cabo en un rango de pH entre 3.0 y 9.0). (B) Efecto de la temperatura en la actividad (las reacciones se incubaron en un intervalo de temperatura entre 5 y 65 °C). (C) Estabilidad térmica. La enzima se incubó a 25 °C (●), 30 °C (○), 37 °C (△) y 45 °C (□), 55 °C (◇) y 65 °C (▽). (D) Efecto de diferentes aditivos en la actividad enzimática. Los experimentos se realizaron por triplicado. Se representa la media y la desviación estándar. La máxima actividad observada se consideró el 100% de actividad.

Lp_3505 presentó un pH óptimo de 6,0 (Figura 35A). Anteriormente se describió una acetilesterasa de *L. plantarum* que presentaba un pH óptimo de 6,7 (Otherholm et al., 1972). Lp_3505 presentó la actividad máxima a 5 °C y fue activa únicamente a bajas temperaturas, ya que a 37 °C exhibió una actividad residual (Figura 35B). Como se ha comentado anteriormente en el caso de Lp_2631, no se han descrito esterases con una actividad máxima a temperaturas de refrigeración en bacterias lácticas y esta propiedad es importante en fermentaciones de alimentos (Papon y Talon, 1988).

Esta elevada actividad a bajas temperaturas, con frecuencia se asocia con una baja termoestabilidad (Feller y Gerday, 2003). Con el fin de conocer la termoestabilidad de la enzima Lp_3505, se incubó la enzima a diferentes temperaturas durante varios intervalos de tiempo. Como se observa en la Figura C, la enzima sólo mantuvo una actividad significativa en incubaciones prolongadas a 20 °C. Estos indicarían que Lp_3505 es una arilesterasa adaptada al frío y termolábil, al contrario que Lp_2631, otra arilesterasa adaptada al frío pero que es termoestable.

Se estudió el efecto de varios iones y aditivos sobre la actividad de Lp_3505 (Figura 35D). La actividad enzimática se duplicó en presencia de los iones Ni^{2+} , Cu^{2+} , y Zn^{2+} , sin embargo, Hg^{2+} inhibió significativamente la actividad. Entre los detergentes ensayados, el SDS inhibió completamente la actividad de Lp_3505. La enzima también resultó inhibida parcialmente por PMSF, confirmando la implicación de una serina en el centro activo de la enzima.

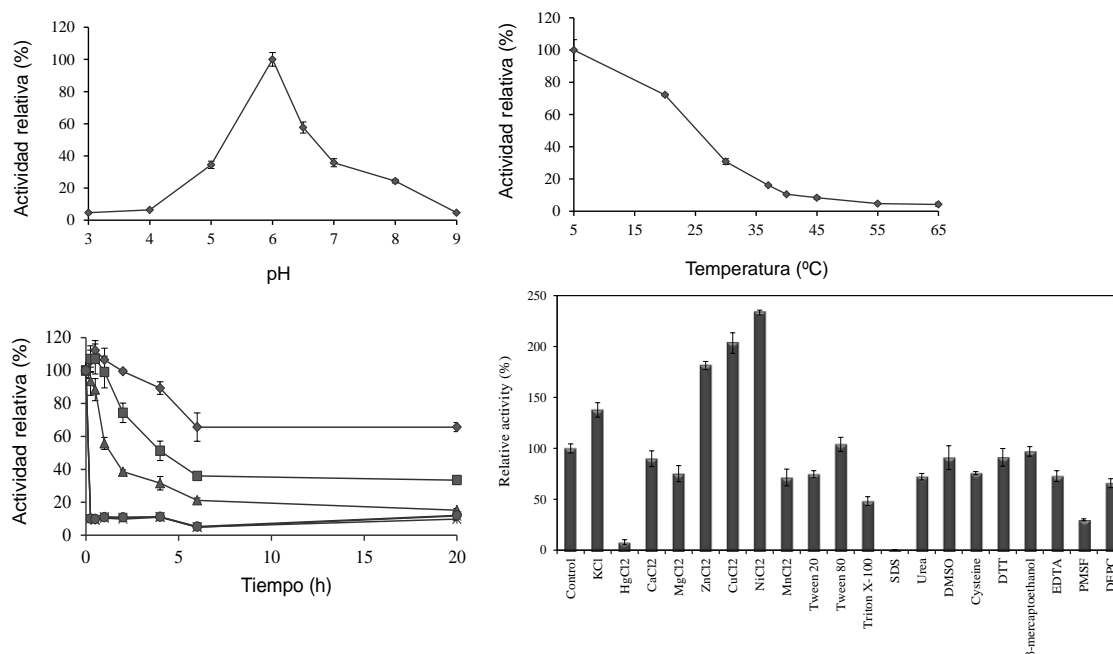


Figura 35. Caracterización de la arilesterasa Lp_3505 de *L. plantarum* WCFS1. (A) Efecto del pH (las reacciones con la enzima se llevaron a cabo en un rango de pH entre 3.0 y 9.0). (B) Efecto de la temperatura en la actividad (las reacciones se incubaron en un intervalo de temperatura entre 5 y 65 °C). (C) Estabilidad térmica. La enzima se incubó a 25 °C (○), 30 °C (□), 37 °C (△) y 45 °C (◇) en tampón fosfato 50 mM pH 7.0. (D) Efecto de iones metálicos y aditivos en la actividad enzimática. Los experimentos se realizaron por triplicado. Se representa la media y la desviación estándar. La máxima actividad observada se consideró el 100% de actividad.

1.4.1.6. Lp_3561

La enzima Lp_3561 de *L. plantarum* WCFS1 presentó actividad arilesterasa, por lo que se analizaron sus propiedades bioquímicas más relevantes, utilizando acetato de *p*-nitrofenilo como sustrato, siguiendo la

absorbancia a 348 nm. La proteína presentó una actividad específica de 144,73 U/mg.

Lp_3561 presentó un pH óptimo de 6,5 para la hidrólisis de acetato de *p*-nitrofenilo (Figura 36A), aunque a pH 7,0 y 8,0 presentó también elevada actividad. Este valor de pH es bastante frecuente en esterasas de *Lactobacillus* (Gobbeti et al., 1996; Fenster et al., 2003; Gobbeti et al., 1997). Con respecto a la temperatura, la actividad máxima de Lp_3561 se obtuvo a 40 °C, aunque a temperaturas superiores mantuvo una elevada actividad (Figura 36B). Un perfil similar de actividad frente a temperatura lo presenta la arilesterasa Lp_1002 descrita en este trabajo así como también otras esterasas descritas previamente como Est28 y EstCOo8 de *O. oeni* {Sumby, 2009 #73; Sumby, 2013 #90}.

Respecto a la termoestabilidad de la proteína, se comprobó que la arilesterasa Lp_3561 es estable en incubaciones prolongadas incluso a 65 °C, ya que mantuvo un 30% de actividad residual después de 20 h de incubación (Figura 36C). Estos resultados parecen indicar que la arilesterasa Lp_3561 es la más estable de las esterasas descritas en este trabajo, así como también entre otras arilesterasas descritas en la bibliografía (Navarro-Gonzalez, et al., 2012).

Se evaluó el efecto de distintos aditivos sobre la actividad enzimática de la arilesterasa Lp_3561 de *L. plantarum* WCFS1 (Figura 36D). Detergentes como el Tween 20, Tween 80 y Tritón X-100 incrementaron la actividad de la enzima levemente y de forma similar a lo descrito previamente en otras esterasas, como una arilesterasa de la familia SGNH aislada del rumen de cabra EstR5, que mejoró su actividad en presencia de Tween 20, 40 y 80 y Tritón X-100 (Wang et al., 2011) y en una arilesterasa de *S. solfataricus* (Park et al., 2008). Otro detergente, el SDS, presentó un efecto desnaturalizante sobre la enzima, ya que redujo la actividad un 86%. La presencia de cationes divalentes ejerció un efecto variable, ya que algunos mejoraron parcialmente la actividad Lp_3561 como el Mn^{2+} , sin embargo cationes como Hg^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} y Cu^{2+} inhibieron la actividad. Este efecto de los metales sobre la actividad

esterasa fue similar al descrito para la tributirin esterasas de *L. plantarum* (Gobbetti et al., 1996). En el caso de Lp_3561, la urea actuó como un desnaturalizante ya que inhibió totalmente la actividad, sin embargo este agente no ejerció ningún efecto sobre las otras arilesterasas descritas en este trabajo. El inhibidor específico PMSF también ejerció un efecto inhibitor, indicando que una serina está implicada en la actividad catalítica de la enzima.

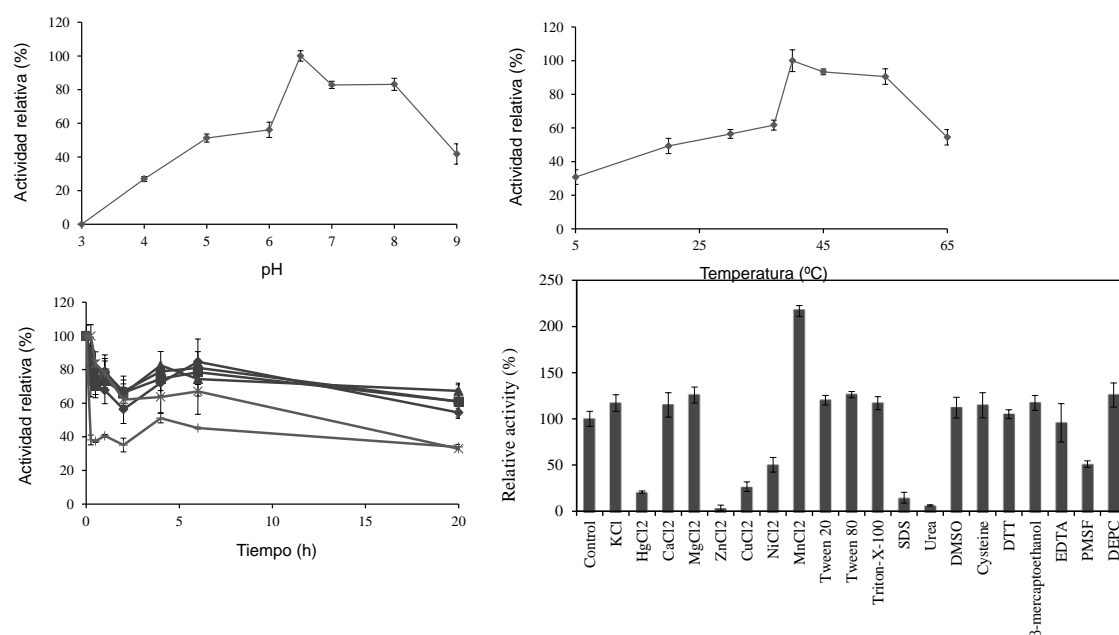


Figura 36. Caracterización de la arilesterasa Lp_3561 de *L. plantarum* WCFS1. (A) Efecto del pH en la actividad (las reacciones con la enzima se llevaron a cabo en un rango de pH entre 3.0 y 9.0). (B) Efecto de la temperatura en la actividad (las reacciones se incubaron en un intervalo de temperatura entre 5 y 65 °C). (C) Estabilidad térmica. La enzima se incubó a 25 °C (círculos), 30 °C (cuadrados), 37 °C (triángulos) y 45 °C (rombos) en tampón fosfato 50 mM pH 7.0. (D) Efecto de iones metálicos y aditivos en la actividad enzimática. Los experimentos se realizaron por triplicado. Se representa la media y la desviación estándar. La máxima actividad observada se consideró el 100% de actividad.

1.4.2. Identificación y caracterización bioquímica de feruloil esterasas

En esta tesis se ha descrito que la proteína Lp_0796 es una feruloil esterasa, ya que mediante un ensayo colorimétrico utilizando p-nitrofenol como indicador de pH se comprobó que hidrolizó, entre otros ésteres, los sustratos típicos de feruloil esterasas (*p*-cumarato de metilo, cafeato de metilo, ferulato

de metilo y sinapinato de metilo). Esta actividad feruloil esterasa se verificó mediante una técnica analítica más precisa como la cromatografía de alta resolución (HPLC). Para ello se incubó la enzima pura (100 µg) en presencia de los cuatro ésteres hidroxicinámicos (*p*-cumarato de metilo, cafeato de metilo, ferulato de metilo y sinapinato de metilo) a una concentración final de 1 mM. Como se observa en la Figura 37, Lp_0796 hidrolizó totalmente los cuatro ésteres, originando los ácidos correspondientes (ácido *p*-cumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico y ácido sinápico). De esta forma queda demostrado que la proteína Lp_0796 es una feruloil esterasa. Las feruloil esterases se clasifican en función de la especificidad de sustrato que presentan sobre los ésteres de ácidos hidroxicinámicos (Crepin et al., 2004). La clase A de feruloil esterases. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, Lp_0796 se puede considerar una feruloil esterasa de tipo C, ya que hidrolizó los cuatro ésteres de metilo de los ácidos hidroxicinámicos {Benoit, 2006 #119}.

La actividad feruloil esterasa observada en los extractos celulares de *L. plantarum* WCFS1 podría deberse a la enzima Lp_0796, ya que como se ha demostrado hidroliza los 4 ésteres de ácidos hidroxicinámicos. Es interesante destacar que la actividad hidrolítica observada en los extractos de *L. plantarum* WCFS1 no se correlaciona exactamente con la actividad observada en la enzima pura Lp_0796, ya que los ésteres cafeato de metilo y sinapinato de metilo no se hidrolizaron mediante los extractos celulares. Puesto que sólo se observó una leve hidrólisis de ferulato de metilo y *p*-cumarato de metilo en los extractos celulares, es posible que Lp_0796 pueda presentar mayor actividad sobre estos sustratos, y por tanto, la actividad sobre cafeato de metilo y sinapinato de metilo no se detectó. Sin embargo, aunque el resto de esterases caracterizadas en esta tesis no presentaron actividad feruloil esterasa, no se descarta la presencia de otras enzimas que presenten dicha actividad en *L. plantarum* WCFS1.

La secuencia de aminoácidos deducida de Lp_0796 carece de péptido señal en la región N-terminal, por lo que posiblemente Lp_0796 se localiza intracelularmente. Se ha descrito que varias esterases y lipasas de *L. plantarum* (Gobbetti et al., 1996; Gobbetti et al., 1997) y de otras bacterias

lácticas, como *L. casei* (Castillo et al., 1999) y *Streptococcus thermophilus* (Liu, et al., 2010), se localizan intracelularmente. Por lo que la lisis celular es importante para la liberación de estas enzimas durante los procesos de fermentación o durante el paso por el tracto gastrointestinal.

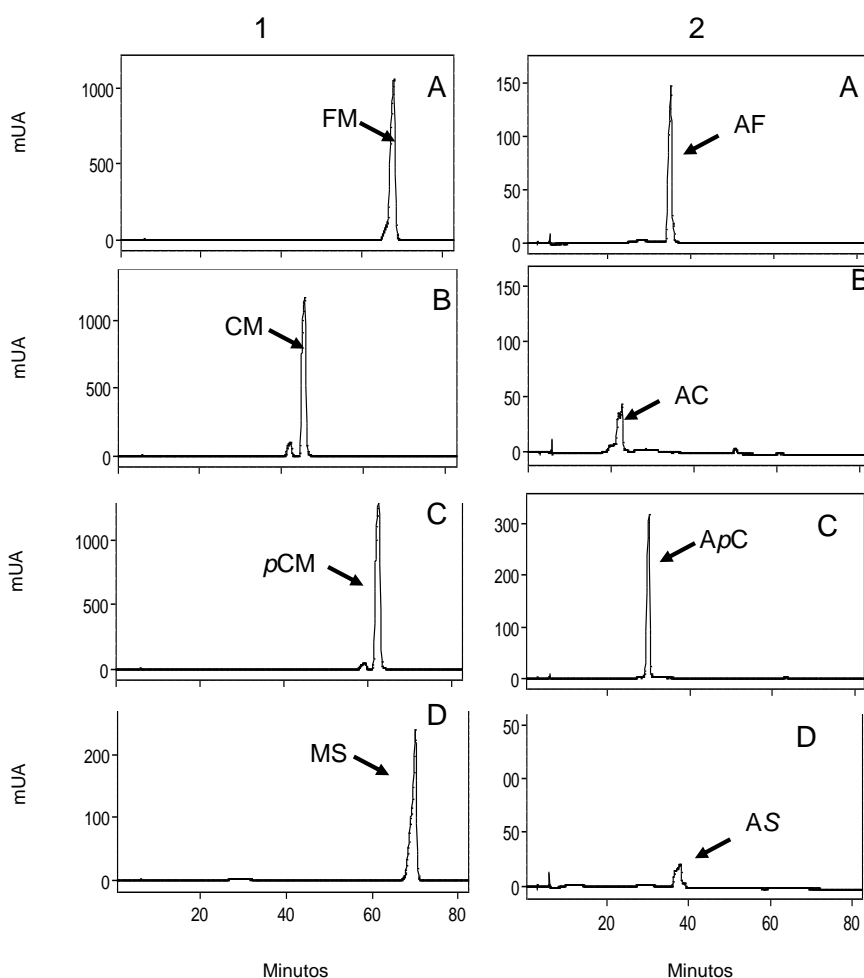


Figura 37. Hidrólisis de ésteres de ácidos hidroxicinámicos por la feruloil esterasa Lp_0796 de *L. plantarum* WCFS1 mediante HPLC. (1) Controles incubados en tampón fosfato 50 mM pH 7 en presencia de 1 mM de ferulato de metilo (A), cafeato de metilo (B), *p*-cumarato de metilo (C) y sinapinato de metilo (D) a 30 °C durante 10 horas. (2) Actividad de Lp_0796 (100 µg) en presencia de 1 mM ferulato de metilo (A), cafeato de metilo (B), *p*-cumarato de metilo (C) y sinapinato de metilo (D) a 30 °C durante 10 horas. Se indica la presencia de ferulato de metilo (FM), cafeato de metilo (CM), *p*-cumarato de metilo (pCM), sinapinato de metilo (SM), ácido ferúlico (AF), ácido cafeico (AC), ácido *p*-cumárico (ApC) y ácido sinápico (AS). Los cromatogramas se obtuvieron a 280 nm. UA (unidades de absorbancia).

1.4.2.1. Lp_0796

Teniendo en cuenta que la esterasa Lp_0796 de *L. plantarum* WCFS1 es una feruloil esterasa y estas enzimas presentan un amplio rango de aplicaciones, se decidió caracterizar sus propiedades bioquímicas. Para ello se utilizó butirato de *p*-nitrofenilo como sustrato, ya que fue el sustrato que mejor hidrolizó. Lp_0796 presentó una actividad específica de 92 U/mg.

Según los resultados obtenidos en esta tesis, en la que se han ensayado diversos valores de pH (3,0-8,0), la feruloil esterasa Lp_0796 presentó un máximo de actividad a pH 7,0 (Figura 38A), aunque también presentó una elevada actividad entre pH 5,0 y 8,0. Estos resultados son similares a los obtenidos previamente por Navarro-González et al. (2013), que caracterizaron previamente esta enzima de *L. plantarum* WCFS1, aunque en su estudio la enzima presentó una actividad óptima a pH 8,0. En ambos estudios la enzima es activa en el rango de pH 5,0-8,0. Las feruloil esterases descritas de *L. johnsonii* presentaron unos valores de pH óptimos similares (Lai, et al., 2009).

En el intervalo de temperaturas estudiado, se observó que la enzima presenta una actividad óptima entre 30-37 °C presentando una actividad residual a 45 °C. (Figura 38B). De hecho, Lp_0796 se puede clasificar como una enzima termolábil, ya que su actividad disminuye drásticamente a 45 °C en periodos cortos de incubación (Figura 38C). Estos resultados coinciden con los obtenidos previamente por Navarro-González et al. (2013), y con los observados para otras esterases descritas en este trabajo como las arilesterases Lp_0973 y Lp_2923. Una arilestera de *L. helveticus* (Fenster et al., 2000) o una feruloil esterasa de *L. johnsonii* (Lai, et al., 2009) presentaron características bioquímicas similares a la feruloil esterasa Lp_0796.

En las enzimas esterases es interesante analizar el efecto de detergentes así como el efecto de solventes orgánicos para comprobar la potencialidad de cada enzima para utilizarse como catalizador en medios no-acuosos. También se analizó el efecto de agentes reductores e inhibidores, así como de iones metálicos, ya que aunque estas enzimas no requieren cofactores (Bornscheuer, 2002), la actividad puede incrementar en presencia

de dichos compuestos. Por ello, se estudió el efecto de varios iones (K^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Ca^{2+} , Hg^{2+} , Zn^{2+}), detergentes (Tween 20, Tween 80, Tritón X-100, SDS), quelantes (EDTA), agentes reductores (cisteína, DTT y β -mercaptoetanol), agentes desnaturizantes (urea), solventes orgánicos (DMSO) e inhibidores (EDTA, DEPC, PMSF) en la actividad enzimática de la esterasa Lp_0796 de *L. plantarum* WCFS1 (Figura 38D). Como se puede observar, Lp_0796 presentó un incremento considerable de la actividad en presencia de Tween 20 y Tween 80 (250%) o $ZnCl_2$ (155%). Se ha descrito una esterasa de *L. casei* que se activa en presencia de cationes Zn^{2+} (Castillo et al., 1999). Por el contrario, en presencia de SDS, Hg^{2+} , DTT y PMSF la actividad se inhibió significativamente (actividad relativa del 12 al 35%). La inhibición en presencia de PMSF confirma la presencia de una serina nucleófila en el sitio activo de la enzima.

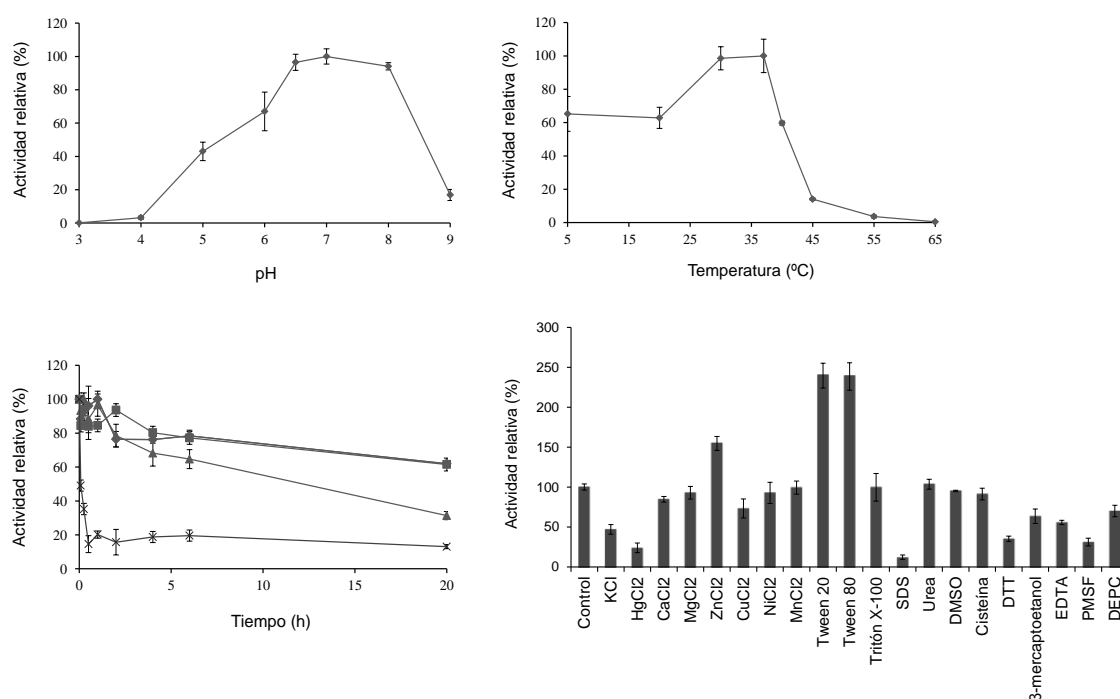


Figura 38. Caracterización de la feruloil esterasa Lp_0796 de *L. plantarum* WCFS1. (A) Efecto del pH en la actividad (las reacciones con la enzima se llevaron a cabo en un rango de pH entre 3.0 y 9.0). (B) Efecto de la temperatura en la actividad (las reacciones se incubaron en un intervalo de temperatura entre 5 y 65 °C). (C) Estabilidad térmica. La enzima se incubó a 25 °C (círculos), 30 °C (cuadrados), 37 °C (triángulos) y 45 °C (rombos) en tampón fosfato 50 mM pH 7.0. (D) Efecto de iones metálicos y aditivos en la actividad enzimática. Los experimentos se realizaron por triplicado. Se representa la media y la desviación estándar. La máxima actividad observada se consideró el 100% de actividad.

1.4.3. Cristalización y resolución de la estructura tridimensional

A pesar de que las bacterias lácticas desempeñan un papel importante en la elaboración de productos fermentados (Rodríguez, et al., 2009), existe poca información sobre estas bacterias como fuente de enzimas útiles en alimentos (Mathews et al., 2004). En el genoma de *L. plantarum* WCFS1 se encuentran numerosas ORF de esterasas y lipasas, lo que destaca el importante papel de estas enzimas en el metabolismo celular. Pese al interés biotecnológico que presentan las enzimas con actividad esterasa en general y de arilesterasas en particular, sólo se ha depositado la estructura de las arilesterasas Lp_1002 (código PDB: 3bjr) y Lp_2923 (código PDB: 3d3n y 3bxp) de *L. plantarum* en la base de datos. Entre las estructuras depositadas no aparecen otras esterasas o arilesterasas de bacterias lácticas, excepto una cinamoil esterasa de *L. johnsonii* (código PDB: 3pf8) {Lai, 2011 #92}. Dentro de las esterasas, las arilesterasas presentan un elevado interés biotecnológico puesto que actúan sobre ésteres aromáticos. Teniendo en cuenta que las arilesterasas han sido menos estudiadas que otras esterasas, se decidió determinar la estructura tridimensional a alta resolución de dos arilesterasas de *L. plantarum* WCFS1 mediante cristalografía de proteínas (estudios que se han desarrollado en colaboración con el grupo del Dr. José M. Mancheño del Instituto de Química Física Rocasolano, CSIC). De este modo, se determinó la estructura tridimensional de una arilesterasa con un amplio rango de sustrato (Lp_0973) así como también otra más específica para acetato de fenilo (Lp_2923), ya que los modelos depositados en el PDB de esta última enzima eran incompletos o incorrectos. Las estructuras determinadas han permitido identificar los residuos implicados en la actividad y en la especificidad de la enzima.

1.4.3.1. Lp_0973

Entre las arilesterasas estudiadas en esta tesis, Lp_0973 presentó un amplio perfil de sustratos así como también una elevada actividad enzimática entre las arilesterasas estudiadas en esta tesis. Para resolver la estructura tridimensional de la proteína Lp_0973 de *L. plantarum* WCFS1, en primer lugar, se obtuvieron cristales de la enzima. Para ello, empleando proteína pura (9 mg/ml) se llevaron a cabo experimentos de cristalización mediante difusión de vapor en gota sentada. Los cristales inicialmente obtenidos no permitieron resolver la estructura de la enzima por presentar problemas de maclado (Álvarez et al., 2011). Sin embargo, estos cristales durante su manipulación, se rompían en dos partes aproximadamente iguales, dando lugar a cristales no maclados, adecuados para los estudios estructurales. Teniendo en cuenta que no se pudo resolver la estructura tridimensional de Lp_0973 mediante reemplazo molecular, por no encontrar estructuras homólogas en la base de datos, se prepararon cristales de la proteína Lp_0973 marcada con seleniometionina. De este modo, se obtuvieron cristales de adecuados utilizando la siguiente condición de cristalización: malonato sódico 1 M, Jeffamine ED-2001 0,5% (v/v), HEPES 100 mM pH 7,0, DTT 5 mM. Con estos cristales, finalmente se pudieron recoger datos de difracción hasta una resolución de 2.05 Å en una fuente de radiación sincrotrón, en la línea ID29 del ESRF (European Synchrotron Radiation Facility; Grenoble, Francia), los cuales han permitido resolver y refinar la estructura de la proteína Lp_0973 a esa resolución.

La estructura cristalográfica reveló la naturaleza dimérica de Lp_0973. La Figura 39 muestra la estructura globular de una subunidad de Lp_0973 de *L. plantarum* WCFS1. Las subunidades que constituyen el complejo dimérico son esencialmente idénticas como se puede comprobar al superponerlas. La arquitectura global de las subunidades consiste en una mezcla de estructura β (20%) y hélices α (29%). La proteína pertenece a la superfamilia α/β -hidrolasa (Ollis et al., 1992) y está relacionada con la familia de enzimas HSL (Hemilä et al., 1994). En base a su secuencia de aminoácidos y particularmente, teniendo en cuenta la presencia de motivos específicos en la secuencia, las esterasas

se clasifican en cuatro grupos: C, H, L y X (Hotelier et al., 2004). El grupo H incluye a la familia de carboxilesterasas de plantas y a la familia de lipasas sensibles a hormonas (HSL). Sin embargo, en otra clasificación previa de enzimas lipolíticas bacterianas los miembros de la familia HSL pertenecen a la familia IV, la cual incluye un grupo de enzimas bacterianas que presentan una elevada similitud de secuencia con la lipasa sensible a hormonas de mamíferos (Arpigny & Jaeger, 1999). Algunos miembros de esta familia presentan una actividad elevada a bajas temperaturas (inferiores a 15 °C) al igual que la arilesterasa Lp_0973 (Arpigny & Jaeger, 1999). El análisis de alineamientos múltiples de secuencias revela la presencia del motivo HGGG(A) que contribuye al denominado agujero del oxianión y se encuentra altamente conservado en las enzimas bacterianas de la familia HSL. Los análisis de alineamientos tridimensionales revelaron que Lp_0973 presenta una elevada similitud estructural con las carboxilesterasas termófilas PestE y AFEST de las arqueas *Pyrobaculum calidifontis* (Palm et al., 2011) y *Archaeoglobus fulgidus* (De Simone et al., 2001) respectivamente, seguido por las carboxilesterasas mesófilas Est7 (código PDB: 3k6k) y EstE5 (Nam et al., 2009) y carboxilesterasas termófilas EstE2 y Sto-Est de *Alicyclobacillus acidocaldarius* (De Simone et al., 2000) y *Sulfolobus tokodaii* (Angkawidjaja et al., 2012), respectivamente. Además, presenta una elevada similitud estructural con una heroína esterasa de *Rhodococcus* sp. (Zhu et al., 2003) y con la brefeldina A esterasa (BFAE) de *Bacillus subtilis* (Wei et al., 1999). A pesar de la baja identidad de secuencia entre Lp_0973 y sus homólogos estructurales (~24%), la similitud estructural entre este grupo de proteínas es elevada. Esto se debe principalmente a la presencia de una lámina β central rodeada por hélices α , que define el plegamiento canónico de la súperfamilia de las α/β -hidrolasas. Estas proteínas presentan una triada catalítica formada por el nucleófilo Ser174, His313 y Asp283. Por otro lado, se observa una elevada variabilidad estructural en la región llamada “tapadera” (*cap*) situada sobre del centro activo, en el extremo carboxilo de la lámina β central, específico de la familia de enzimas HSL.

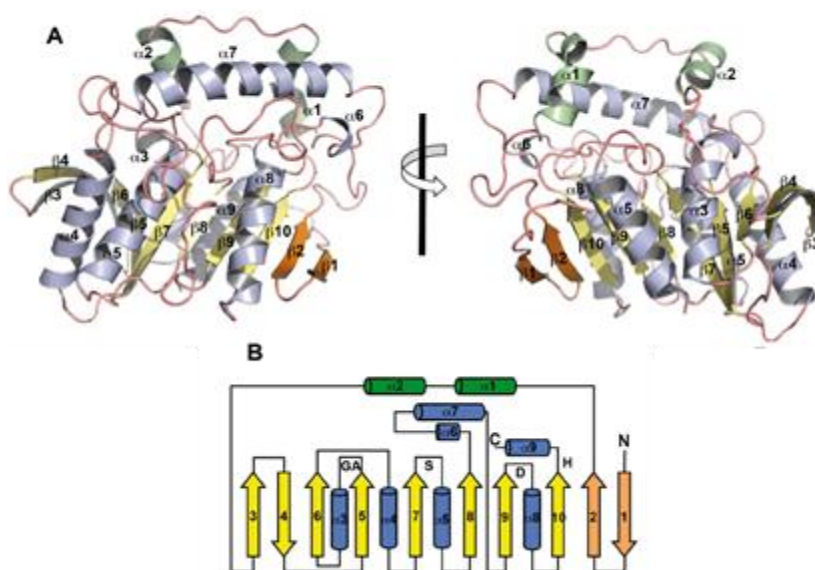


Figura 39. Estructura de la proteína Lp_0973 de *L. plantarum* WCFS1. (A) Diagramas de cintas de una subunidad de Lp_0973. Se representan dos vistas de la subunidad. Las hebras β que forman la lámina β central se muestran en amarillo, salvo las dos hebras N-terminales que son naranjas. Las hélices α se representan en azul, a excepción de las dos previas a la hebra β 3, las cuales se muestran en verde. (B) Diagrama topológico del plegamiento de Lp_0973. El código de color es el mismo que el de la figura A.

Como miembro de la superfamilia α/β -hidrolasa, la estructura presenta una arquitectura en tres capas, con una lámina β central formada por 10 hebras β (2 hebras β extra con respecto al plegamiento típico), rodeadas por 5 hélices α , dos en el lado cóncavo de la lámina (α 3 y α 8) y tres en el lado convexo (α 4, α 5 y α 7) (Figura 39). El orden de las hebras β es β 3, β 4, β 6, β 5, β 7, β 8, β 9, β 10, β 2, β 1, siendo las hebras β 1 y β 4 antiparalelas con respecto a las otras. Cabe destacar que esta topología, en la que dos hebras N-terminales están asociadas con el extremo C-terminal de la lámina β central canónica, no se ha observado en ninguna otra α/β -hidrolasa (Figura 39).

Además de este núcleo β rodeado por α -hélices, Lp_0973 presenta un dominio esencialmente helicoidal que constituye la “tapadera” (De Simone et al., 2001). Este dominio está formado a su vez por dos subdominios (residuos 30-70 y 202-273) que aparecen agrupados alrededor del extremo carboxilo terminal de la lámina β central. En esta zona se han identificado tres hélices α (α 1, α 2 y α 6) y bucles irregulares. La hélice α 7, situada entre las láminas β 8 y β 9, es excepcionalmente larga comparada con las equivalentes del resto de

miembros de la familia HSL e interacciona simultáneamente con las dos hélices amino terminales ($\alpha 1$ y $\alpha 2$) (Figura 39B). Estas tres hélices α forman la parte superior de una especie de embudo en el fondo del cual se localiza la maquinaria catalítica de la proteína. Entre los residuos que se encuentran en las paredes del embudo, aproximadamente el 70% son hidrofóbicos, lo que indica la naturaleza esencialmente hidrofóbica de este entorno. La homología estructural que se encuentra con otras enzimas de la familia HSL permitió la identificación de la maquinaria catalítica de Lp_0973, siendo una triada catalítica clásica formada por los residuos Ser174 como nucleófilo, His313 como la base general que desprotona la serina y Asp283 como el residuo que incrementa el pK_a del anillo imidazólico de la histidina. No obstante, el papel funcional de estos residuos se determinó experimentalmente mediante la construcción de los correspondientes mutantes Ser174Ala, His313Ala y Asp283Ala. Ninguno de estos mutantes presentó actividad esterasa frente a acetato de *p*-nitrofenilo como sustrato modelo. Es importante destacar que se comprobó que las mutaciones introducidas no produjeron cambios conformacionales significativos en estas variantes. Estas variantes de la proteína Lp_0973 se construyeron mediante mutagénesis dirigida por PCR utilizando el plásmido pURI3-TEV-0973 como molde. Para introducir el cambio se emplearon las parejas de oligonucleótidos 1257-1258 (Ser174Ala), 1261-1262 (His313Ala) y 1259-1260 (Asp283Ala) (Materiales y Métodos).

Estos tres residuos catalíticos se localizan en posiciones canónicas en el plegamiento α/β -hidrolasa (Nardini & Dijkstra, 1999). La Ser174 se encuentra en el ápice del llamado “codo nucleófilo” dentro del motivo conservado GX_1SX_2G (GDSAG) de la familia α/β -hidrolasa (Nardini & Dijkstra, 1999). La geometría anómala del esqueleto peptídico de este residuo facilita la formación del “agujero del oxianión” responsable de estabilizar la carga negativa de los intermedios tetraédricos formados durante la reacción catalítica (Nardini & Dijkstra, 1999). El agujero del oxianión en Lp_0973 está formado por los átomos de nitrógeno peptídicos de los residuos Gly107 y Ala108. Una característica notable del entorno del nucleófilo Ser174 es la presencia del residuo ácido Asp173. En Lp_0973, el Asp173 participa en una serie de

interacciones importantes, destacando asimismo la interacción con la Tyr103 que está conservada en todas las proteínas HSL estudiadas.

La estructura cristalográfica de Lp_0973 revela que ésta es un dímero y sorprendentemente, con un modo de asociación de las subunidades totalmente novedoso, no habiéndose descrito para ningún miembro de la súperfamilia de las α/β -hidrolasas y por ello de la familia HSL. Por otro lado, esto es fácilmente comprensible considerando que la asociación “canónica” entre subunidades observada en las α/β -hidrolasas implica la participación del lado C-terminal de la lámina β central, que en el caso de Lp_0973 difiere del resto de las enzimas pues posee las 2 hebras β N-terminales “extra” antes descritas. En este nuevo modo de asociación, la interfase de contacto está formada por las cadenas laterales de los aminoácidos de los bucles largos de conexión entre la hélice $\alpha 6$ y la hebra $\beta 9$ y entre la hélice $\alpha 5$ y la hebra $\beta 8$, y también de residuos de las hélices $\alpha 4$ y $\alpha 5$ de cada subunidad (Figura 40).

El carácter novedoso del dímero de Lp_0973 demandó la caracterización de su estado oligomérico en solución. Para ello, se analizó la masa molecular de la enzima mediante métodos analíticos, tanto cromatográficos como por ultracentrifugación. Los resultados de los experimentos de filtración en gel revelaron que la proteína se comporta en solución como una única especie con una masa molecular de $78,3 \pm 3,2$ kDa, que corresponde al valor teóricamente esperado del dímero (77 kDa). Por otro lado, los estudios de ultracentrifugación analítica (velocidad de sedimentación) indicaron que Lp_0973 se comporta como una única especie homogénea con un coeficiente de sedimentación de 4,5 S, en tanto que los experimentos de equilibrio de sedimentación eran consistentes con un modelo ideal que considera una única especie con una masa molecular de $77,2 \pm 4,2$ kDa. Por lo tanto, en resumen, las diferentes aproximaciones metodológicas demuestran el carácter dimérico de Lp_0973.

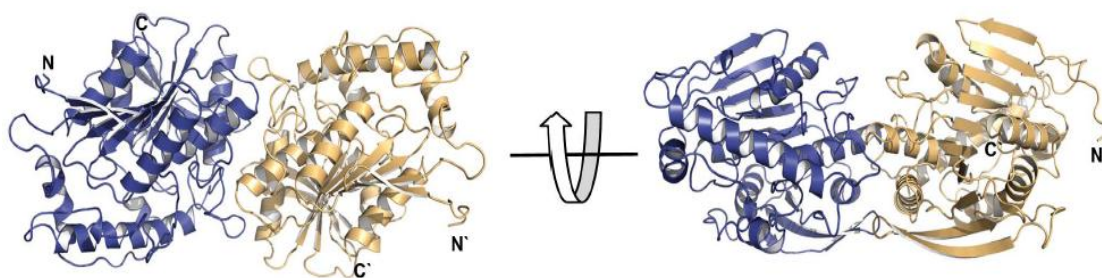


Figura 40. Representación del dímero de Lp_0973 de *L. plantarum* WCFS1. Se representan dos vistas ortogonales del dímero de Lp_0973 en el cual cada subunidad se muestra como un diagrama de cintas con un color diferente.

En esta tesis se ha descrito que la arilesterasa Lp_0973 hidrolizó los sustratos acetato de fenilo, triacetina y tributirina, entre otros (Figura 40). El conocimiento estructural detallado del centro activo de Lp_0973 así como el uso de restricciones funcionales derivadas de la participación de la Ser174 en el mecanismo de hidrólisis, permitió llevar a cabo experimentos de ajuste (*docking*) con dichos sustratos, con el fin de determinar los residuos que confieren la especificidad de la enzima.

Los mejores resultados localizan al grupo carbonilo hidrolizable cerca del grupo hidroxilo de la Ser174 que a su vez se estabiliza principalmente por dos enlaces de hidrógeno entre los grupos NH de Gly107 y Ala108. Los tres complejos enzima:sustrato propuestos revelan que la parte ácida de estos sustratos se inserta en un pequeño sub-bolsillo hidrofóbico (S1) formado por los residuos Met245, Phe285, Leu241 y Val204, y la parte alcohol se encontraría en un sub-bolsillo grande (S2). Aparentemente, esta arquitectura particular del bolsillo de unión del sustrato en dos sub-bolsillos diferentes señala que la actividad hidrolítica de Lp_0973 está dirigida sobre ésteres con una parte ácida pequeña pero por el contrario frente a grupos alcohol grandes. Esta predicción se correlaciona perfectamente con la especificidad de sustrato que presentó la enzima, capaz de hidrolizar un éster aromático como el acetato de fenilo, con un grupo alcohol voluminoso.

1.4.3.2. Lp_2923

En este trabajo se ha demostrado que la proteína Lp_2923 de *L. plantarum* WCFS1 es una arilesterasa muy específica teniendo en cuenta el espectro de actividad que presenta. La estructura tridimensional de Lp_2923 se ha resuelto previamente por dos consorcios de genómica estructural independientes [*Joint Center for Structural Genomics* (JCSG), y *NorthEast Structural Genomics* (NESG); código PDB: 3bxp para JCSG y 3d3n para NESG]. En ambos casos, sin embargo, los modelos depositados son incompletos o presentan características estructurales incompatibles con la existencia de una triada catalítica típica. La esterasa Lp_2923 presentó un patrón de especificidad diferente al de la arilesterasa Lp_0973, ya que posee una elevada selectividad sobre acetato de fenilo. Teniendo esto en cuenta, se decidió determinar su estructura tridimensional completa. Para ello, tras purificar Lp_2923 a homogeneidad, se llevaron a cabo experimentos de cristalización mediante difusión de vapor en gota sentada. De este modo, se obtuvieron cristales de calidad empleando la siguiente condición de cristalización: sulfato amónico 1,7 M, acetato sódico 0,15 M, pH 4,6. Con ellos se han podido recoger datos de difracción hasta una resolución máxima de 2,1 Å en una fuente de radiación sincrotrón (ESRF; Grenoble, Francia), los cuales han permitido resolver y refinar la estructura completa de la proteína Lp_2923 a esa resolución.

La estructura de Lp_2923 se determinó mediante reemplazamiento molecular utilizando como modelo las coordenadas atómicas de la enzima depositada por el *NorthEast Structural Genomics* (código PDB: 3d3n), ya que dicho modelo de Lp_2923, aunque es incompleto no presenta las anomalías estructurales antes mencionadas. La estructura general de Lp_2923 se basa en un plegamiento canónico α/β -hidrolasa (Heikinheimo et al., 1999), compuesto por una lámina β central formada por 8 hebras, siendo la hebra $\beta 2$ la única antiparalela (Figura 41). Este núcleo se encuentra rodeado por 5 hélices α con las hélices $\alpha 1$ y $\alpha 7$ a un lado de la lámina y $\alpha 2$, $\alpha 3$ y $\alpha 6$ en el lado opuesto. A

pesar de que Lp_2923 se clasifica como miembro de la subfamilia HSL de α/β hidrolasas según la base de datos ESTHER, la enzima no presenta el dominio “tapadera” sobre el centro activo, que es una característica distintiva de esta familia. Sin embargo, el *loop* que se encuentra entre la lámina β 8 y la hélice α 7 es altamente flexible, y podría funcionar como una pseudo-“tapadera”.

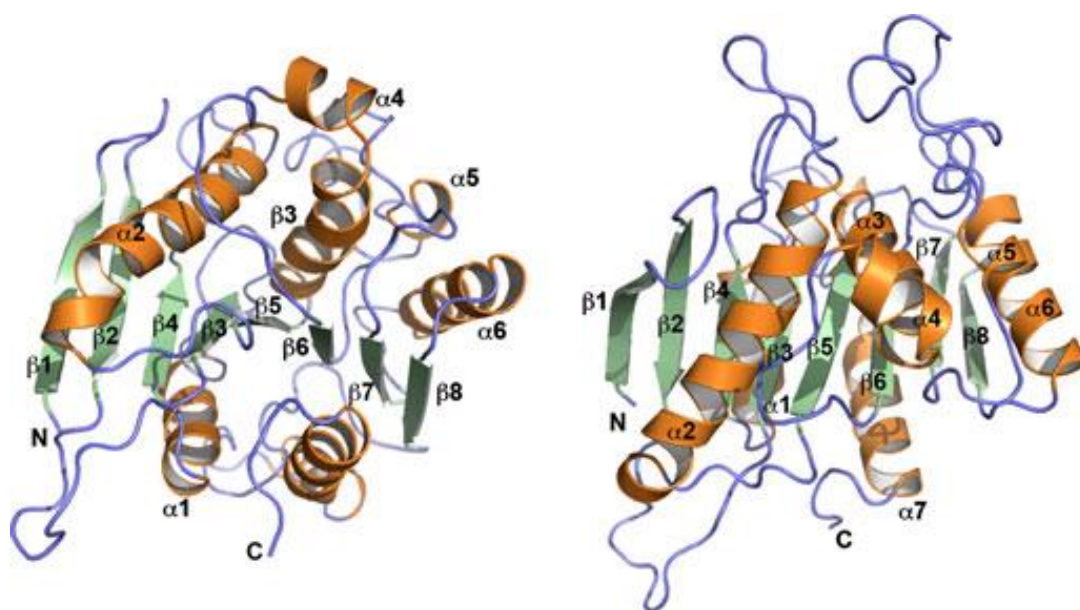


Figura 41. Estructura de la proteína Lp_2923 de *L. plantarum* WCFS1. Diagramas de cintas de una subunidad de la proteína Lp_2923 de *L. plantarum* WCFS1, que presenta un plegamiento típico α/β hidrolasa. La lámina β central, formada por 8 hebras β (representadas en verde) se encuentra flanqueada por 5 hélices α (naranja). Se muestran dos vistas ortogonales de la subunidad.

El análisis de alineamientos tridimensionales revela que Lp_2923 presenta numerosos homólogos estructurales, lo cual es esperable por el carácter altamente conservado del plegamiento α/β -hidrolasa canónico (Ollis et al., 1992; Nardini & Dijkstra, 1999; Heikinheimo et al., 1999). La hidrolasa de azúcares YeeB de *L. lactis* (código PDB: 3hxx) y la esterasa Lp_1002 de *L. plantarum* WCFS1 (código PDB: 3bjr) son las que presentan los mayores grados de identidad de secuencia con Lp_2923: 33% y 32%, respectivamente. Otras esterases de la subfamilia HSL como por ejemplo Est1 aislada de muestras de librerías metagenómicas de suelo (Byun et al., 2007), Sto-Est de

Sulfolobus tokodaii (Angkawidjaja et al., 2012), PestE de *Pyrobaculum calidifontis* (Palm et al., 2011) y una acetilesterasa de *Salmonella typhimurium* (código PDB: 3ga7) también son estructuralmente similares. En estos últimos casos, la similitud estructural se limita al núcleo central α/β -hidrolasa (lámina β rodeado por dos capas de hélices α), ya que como se ha indicado previamente, Lp_2923 carece del dominio “tapadera” característico de algunas enzimas de la subfamilia HSL.

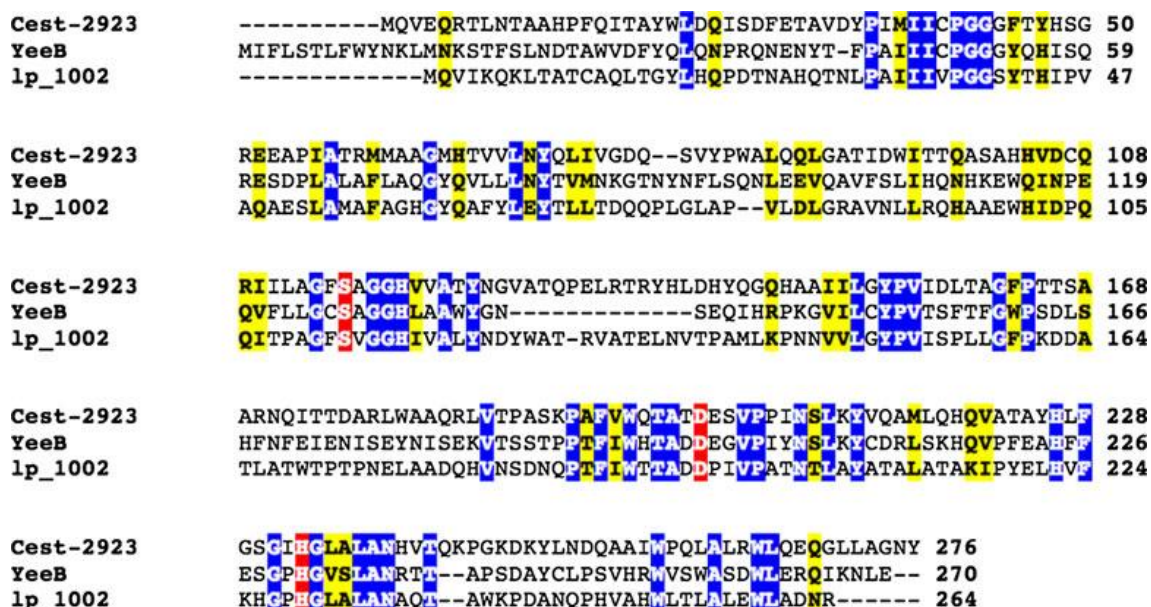


Figura 42. Alineamientos múltiples de las secuencias de aminoácidos de la proteína Lp_2923 de *L. plantarum* WCFS1 con otras esterases homólogas. La arilesterasa Lp_2923 presenta un 33% y un 32% de identidad de secuencia con la putativa hidrolasa de azúcares YeeB de *L. lactis* y la arilesterasa Lp_1002 de *L. plantarum*, respectivamente. En el alineamiento se representan las posiciones conservadas en azul, los residuos similares en amarillo y en rojo los residuos de la triada catalítica en YeeB y Lp_1002.

La maquinaria catalítica de Lp_2923 está constituida por una triada catalítica formada por los residuos Ser116, His233 y Asp201, los cuales se localizan en puntos “canónicos” de la secuencia proteica. La Ser116 es el nucleófilo y se sitúa, como en la enzima Lp_0973, en el llamado codo nucleófilo, en una secuencia altamente conservada Gly-X-Ser-X-Gly, donde X designa cualquier aminoácido (Hemiliä et al., 1994). Durante la catálisis, la

conformación se estabiliza mediante un entramado de puentes de hidrógeno que afectan a la cadena polipeptídica de los residuos cercanos a la serina nucleófila. En esta zona, junto a la Ser116 nucleófila se localiza una molécula de sulfato procedente de la solución de cristalización. Esta molécula ha permitido sugerir interacciones existentes con el agujero del oxianión, ya que se considera como un análogo estructural de los intermediarios tetraédricos formados durante la reacción catalítica.

Como en el caso anterior para Lp_0973, Lp_2923 forma asociaciones diméricas, en este caso, típicas de la súperfamilia de las α/β -hidrolasas, por lo que se pueden clasificar como dímeros canónicos. No obstante, estos dímeros se asocian formando estructuras tetraméricas que, siguiendo la misma lógica, tendrían que clasificarse como no canónicas pues no son comparables con las descritas hasta hoy día. Es muy importante destacar que en los cristales de Lp_2923 empleados por los consorcios de genómica estructural antes mencionados, no aparecen estas asociaciones tetraméricas, lo que indica que su asociación no sólo depende de la concentración de proteína sino de otros parámetros distintos. En este sentido, se observó que las condiciones de cristalización de estos consorcios eran siempre a pH neutro, mientras que las determinadas en este trabajo son a pH muy ácido (4,5). Para verificar si el pH influye en el estado asociativo de Lp_2923 hemos analizado la masa molecular de Lp_2923 en solución mediante experimentos de ultracentrifugación analítica.

Efectivamente, Lp-2923 presentó un comportamiento muy complejo, dependiente del pH, el cual se explica considerando la existencia en solución de especies monoméricas, diméricas y tetraméricas. En tanto que la asociación de monómeros para formar dímeros es muy rápida, la formación de tetrámeros desde dímeros es lenta y dependiente del pH: este equilibrio se desplaza a formas tetraméricas en condiciones ácidas. Se observa, por lo tanto, que los resultados obtenidos mediante ultracentrifugación son consistentes con lo observado en diferentes experimentos de cristalografía.

En los resultados obtenidos con la librería de ésteres se observó que Lp_2923 presentó la máxima actividad con acetato de fenilo y en menor medida con bromoacetato de metilo y acetato de isopropenilo. Estos resultados

sugieren una especificidad más amplia por la parte alcohol del sustrato y una preferencia por grupos ácidos poco voluminosos. Estos tres sustratos se utilizaron para estudios cristalográficos con el fin de determinar la estructura de los complejos correspondientes. Para ello, los cristales nativos se sumergieron en una solución crioprotectora conteniendo el sustrato a una concentración de 10 mM durante 60 segundos. Los cristales preparados con bromoacetato de metilo se rompieron rápidamente, sin embargo con acetato de fenilo y acetato de isopropenilo se recogieron nuevos datos de difracción lo que permitió resolver sus estructuras. Desafortunadamente, éstas no revelaron la presencia de los sustratos pero si proporcionaron evidencias de catálisis en la fase cristal. De esta forma, se pudo observar que la incubación de los cristales con la solución crioprotectora correspondiente no sólo produjo un cambio en el grupo espacial de los cristales, sino que además se vio que la molécula de sulfato que se localizaba junto al nucleófilo, fue sustituido por una de acetato, que es precisamente uno de los productos de la reacción. Teniendo en cuenta que la condición de cristalización de Lp_2923 contiene acetato y que éste no aparece en el centro activo en la estructura nativa, la presencia de esta molécula tras la incubación con los sustratos indica que ha tenido lugar la unión de los mismos y la consiguiente hidrólisis. Estos datos confirman que Lp_2923 es una arilesterasa activa y funcional, que hidroliza específicamente acetato de fenilo además de otros sustratos que hidrolizó en la librería de ésteres como acetato de isopropenilo.

2. Metabolismo de ésteres fenólicos en otras cepas de *L. plantarum*

2.1. Presencia de genes de arilesterasas/feruloil esterasas en otras cepas de *L. plantarum*

Los resultados obtenidos en esta tesis demuestran que *L. plantarum* WCFS1 posee genes que codifican esterasas de ésteres fenólicos, como arilesterasas y feruloil esterasas, las cuales se han caracterizado bioquímicamente. Las esterasas de ésteres fenólicos están muy poco

conocidas en bacterias lácticas. Concretamente, entre las bacterias lácticas únicamente se han descrito arilesterasas en *L. helveticus* (Fenster, et al., 2000) y *L. casei* (Fenster, et al., 2003) y feruloil esterasas de *L. acidophilus* (Wang, et al., 2004) y *L. johnsonii* (Lai, et al., 2009). *L. plantarum* es la bacteria láctica que se encuentra mayoritariamente en fermentaciones de sustratos vegetales donde los ésteres fenólicos son abundantes. Sin embargo, hasta la fecha, la mayor parte del metabolismo de compuestos fenólicos permanece desconocido (Rodríguez, et al., 2009). Entre las esterasas de *L. plantarum* descritas, sólo la esterasa del ácido gálico/protocatéquico (también conocida como tanasa) hidroliza ésteres de compuestos fenólicos (Curiel, et al., 2009). Recientemente, en algunas cepas de *L. plantarum* se ha descrito la presencia de una tanasa adicional (Jiménez et al., 2014). Teniendo en cuenta que no todas las cepas de *L. plantarum* poseen las mismas enzimas esterasas, con objeto de conocer la distribución de las esterasas descritas en este trabajo de *L. plantarum* y de conocer la existencia de otras proteínas, se decidió estudiar la presencia de esterasas en otras cepas de *L. plantarum*.

2.1.1. Presencia de genes en cepas de *L. plantarum* secuenciadas

El primer genoma secuenciado completamente de una cepa de *L. plantarum* fue de la cepa WCFS1 (Kleerebezem, et al., 2003). Sin embargo, en la actualidad se han secuenciado completamente los genomas de las cepas JDM1 (Zhang, et al., 2009), ST-III (Wang, et al., 2011), NC8 (Axelsson, et al., 2012), ZJ316 (Li, et al., 2013), UCMA 3037 (Naz et al., 2013), IPLA88 (Ladero et al., 2013), 16 (Crowley et al., 2013), AY01 (Li et al., 2013), WJL (Kim et al., 2013), Lp91 (Grover et al., 2013), EGD-AQ4 (Qureshi et al., 2014) y 2165 (Karlysheva & Abramovb, 2014) y se están secuenciando las cepas P-8, 2025, 4_3, ATCC 14917^T y DOMLa (parte de estas secuencias se encuentran disponibles). El análisis de estas secuencias se muestra en la Tabla 7, donde se presentan las proteínas anotadas fundamentalmente como “esterasas” en las secuencias disponibles de todos los genomas de las cepas de *L. plantarum* secuenciadas (“pangenoma”). En el estudio se han incluido proteínas anotadas como “esterasas” en otras cepas y que no están presentes en la cepa WCFS1

o bien se encuentran anotadas con otras funciones. Este es el caso de las proteínas JDM1_1092, JDM1_2133 y JDM1_2658 anotadas como “esterasa/lipasa”, “acetilesterasa” y “esterasa” respectivamente en la cepa JDM1. Las proteínas JDM1_2133 y JDM1_2658 se encuentran anotadas con distintas funciones ya que sus proteínas homólogas en la cepa WCFS1 aparecen como acetilxilosidasa (Lp_2660) y beta-lactamasa (Lp_3312) respectivamente. Como se observa en la Tabla 7 hay esterases que se encuentran en todas las cepas secuenciadas, sin embargo también existen proteínas presentes sólo en determinadas cepas, como las proteínas JDM1_1092, Lp_3561 y Lp_3562. La proteína JDM1_1092 es la que aparece en el menor número de cepas, únicamente en cinco cepas (JDM1_1092, ZJ316, 2025, EGD-AQ4 y DOMIa), de un total de 16 cepas secuenciadas. Se trata de un caso similar a la tanasa TanA_{Lp} que aparece en un reducido número de cepas como ATCC 14917^T y NC8 (Jimenez, et al., 2014).

Resultados y Discusión

Tabla7. Presencia de proteínas anotadas como “esterasas” en los genomas de las cepas de *L. plantarum* secuenciadas

WCFS1	JDM1	ST-III	P-8	ZJ316	NC8	16	UCMA 3037	IPLA88	ATCC 14917 ^T	2025	WJL	2165		AY01	EGD- AQ4	4_3	DOMLa
lp_0796																	
esterasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
lp_0973																	
esterasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
lp_1002																	
asa/esterasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
-	JDM1_1092 esterasa/lipasa	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
lp_1328																	
rofosfodiester																	
fodiesterasa	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
lp_1578																	
rofosfodiester																	
fodiesterasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
lp_1760																	
asa/esterasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
lp_2631																	
asa/esterasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
lp_2660																	
etilxilosidasa	JDM1_2133 acetilesterasa	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
lp_2923																	
asa/esterasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
lp_2953																	
esterasa	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
lp_2960																	
asa/esterasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
lp_3312																	
a-lactamasa	JDM1_2658 esterasa	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
lp_3323																	
asa/esterasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
lp_3505																	
etilesterasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
lp_3561																	
asa/esterasa	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+
lp_3562																	
asa/esterasa	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+

2.1.2. Presencia de genes en una colección de cepas de *L. plantarum*

Con el fin de conocer la presencia de los genes que codifican las proteínas anotadas como “esterasas” entre las cepas de *L. plantarum*, se estudió la presencia de 15 genes en 30 cepas de la especie *L. plantarum* aisladas de diferentes orígenes. Para ello se amplificaron los genes *lp_0796* (oligonucleótidos 703-704, 750 pb), *lp_0973* (oligonucleótidos 563-564, 1020 pb), *lp_1002* (oligonucleótidos 565-566, 795 pb), *lp_1328* (oligonucleótidos 705-706, 687 pb), *lp_1578* (oligonucleótidos 707-708, 735 pb), *lp_1760* (oligonucleótidos 567-568, 753 pb), *lp_2631* (oligonucleótidos 569-570, 786 pb), *lp_2660* (oligonucleótidos 677-678, 849 pb), *lp_2923* (oligonucleótidos 571-572, 831 pb), *lp_2953* (750), *lp_3312* (990 pb), *lp_3505* (oligonucleótidos 679-680, 792 pb), *lp_3561* (oligonucleótidos 573-574, 837 pb), *lp_3562* (oligonucleótidos 575-576, 837 pb) y *JDM1_1092* (oligonucleótidos 1230-1231, 888 pb). Los oligonucleótidos empleados para amplificar los correspondientes genes, se diseñaron en base a la secuencia de la cepa *L. plantarum* WCFS1 excepto el gen *JDM1_1092*, para el cual se empleó la secuencia de la cepa *L. plantarum* JDM1.

Como se observa en la Tabla 8, casi todos los genes se encuentran presentes en la mayoría las cepas de *L. plantarum* analizadas. Sin embargo los genes *lp_3561* y *lp_3562*, genes contiguos en el cromosoma, se encuentran sólo en 12 de las 30 cepas (datos no mostrados). De manera similar, el gen *JDM1_1092* es el menos frecuente, pues está presente sólo en 7 de las cepas estudiadas (24%) (*L. plantarum* CECT 220, CECT 221, CECT 223, CECT 224, DSM 1055, RM 35 y RM 73) (Figura 43). Esta proporción es similar a la encontrada entre las cepas de *L. plantarum* secuenciadas, siendo el gen *JDM1_1092* el menos representado (28%). Aunque las cepas de *L. plantarum* se pueden subdividir en dos subespecies: *L. plantarum* subsp. *plantarum* y *L. plantarum* subsp. *argentoratensis*, en principio el gen *JDM1_1092* no se encuentra asociado a ninguna de ellas. Las cepas que presentan el gen *JDM1_1092* se aislaron de diferentes orígenes como ensilaje de maíz (CECT 220), ensilaje de hierba (CECT 221) o mosto de uva y vino (RM35 y RM73),

siendo todos ellos sustratos vegetales donde los ésteres de compuestos fenólicos son abundantes. Se ha descrito que las esterasas se encuentran ampliamente distribuidas en animales, plantas y microorganismos (Bornscheuer et al., 2002), concretamente en las comunidades microbianas actúan en la mayoría de ambientes donde presentan importantes funciones fisiológicas (Martínez-Martínez et al., 2013). La elevada representación de genes de esterasas en *L. plantarum* se puede deber a que estas enzimas presentan actividad sobre un amplio rango de sustratos lo que sugiere que están implicadas en el acceso a fuentes de carbono (Bornscheuer, 2002). Además, *L. plantarum* se encuentra en ambientes ricos en nutrientes y presenta un metabolismo muy versátil (Kleerebezem et al., 2003). Probablemente, el gen *JDM1_1092*, al encontrarse en muy pocas cepas se ha incorporado al genoma de dichas cepas recientemente proveniente de otras especies con las que comparta nichos ecológicos.

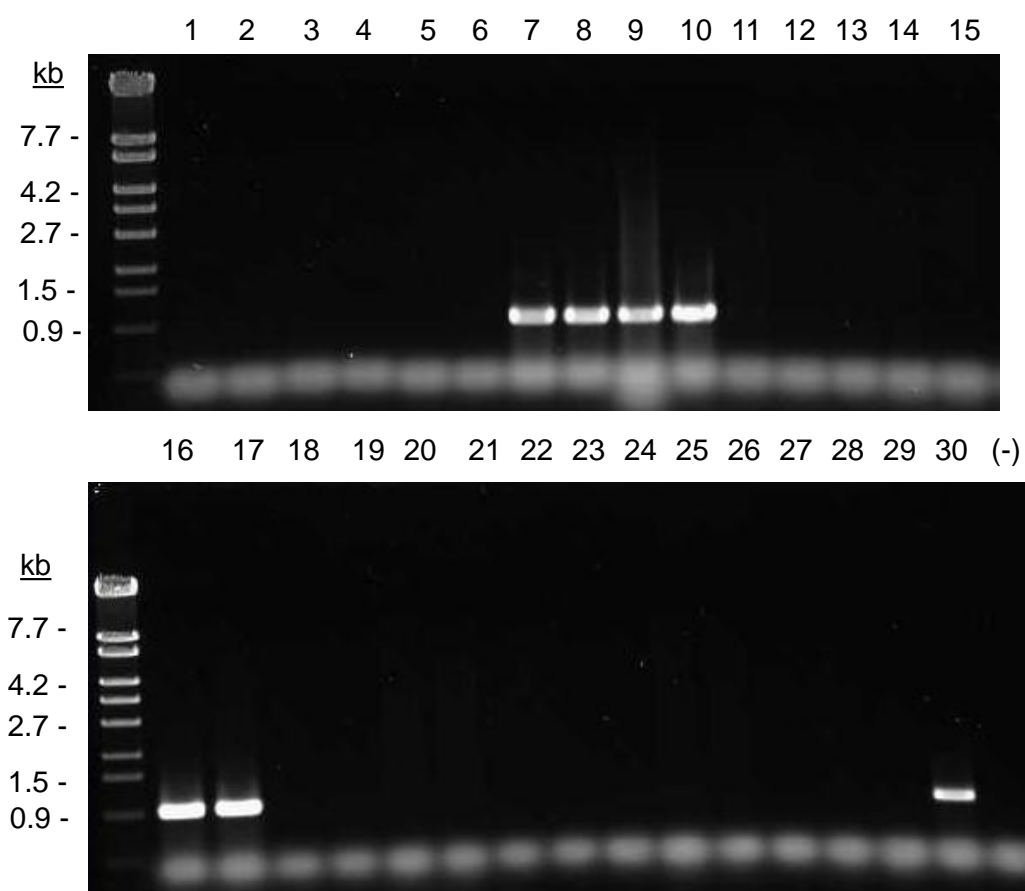


Figura 43. Amplificación del gen *JDM1_1092* (888 pb) en cepas de la especie *L. plantarum*; (1) NC8; (2) CECT 748^T (ATCC 14917^T); (3) DSM 26365^T; (4) 749; (5) WCFS1; (6) 57/1; (7) CECT 220; (8) CECT 221; (9) CECT 223; (10) CECT 224; (11) CECT 4185; (12) CECT 4645; (13) RM 28; (14) RM 72; (15) RM 73; (16) DSM 1055; (17) DSM 2648; (18) DSM 10492; (19) DSM 13273; (20) DSM 20246; (21) DSM 10677^T; (22) DSM 10641 (ATCC 10776); (23) RM 39; (24) RM 40; (25) RM 41; (26) RM 71; (27) RM 31; (28) RM 34; (29) RM 35; (30) RM 38. El marcador de peso molecular λ -EcoT14 se representa a la izquierda.

Tabla 8. Presencia de los genes de esterasas en varias cepas de *L. plantarum* de diferentes orígenes

Cepa	PCR genes esterasas													
	<i>lp_0796</i>	<i>lp_0973</i>	<i>lp_1002</i>	<i>lp_1328</i>	<i>lp_1578</i>	<i>lp_1760</i>	<i>lp_2631</i>	<i>lp_2660</i>	<i>lp_2923</i>	<i>lp_3393</i>	<i>lp_3505</i>	<i>lp_3561</i>	<i>Lp_3562</i>	<i>JDM1_1092</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>														
WCFS1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
NC8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
57/1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
CECT 220	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CECT 221	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
CECT 223	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
CECT 224	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+
CECT 749 (ATCC 10241)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
CECT 4185	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-
CECT 4645	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
DSM 1055	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
DSM 2648	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
DSM 10492	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
DSM 13273	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
DSM 20246	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
RM28	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
RM 31	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
RM 34	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
RM 35	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
RM 38	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
RM 39	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
RM 40	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
RM 41	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
RM 71	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
RM 72	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
RM 73	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
<i>L. plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>														
CECT 748 ^T (ATCC 14917 ^T)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>L. plantarum</i> subsp. <i>argenterantis</i>														
DSM 26365 ^T	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Lactobacillus paraplantarum</i>														

El análisis *in silico* del genoma de las cepas de *L. plantarum* secuenciadas que presentan el gen que codifica la proteína JDM1_1092 (JDM1, ZJ316, 2025, EGD-AQ4 y DOMIa), éste se localiza entre un regulador transcripcional de la familia AraC (*JDM1_1091*) y una proteína transportadora (*JDM1_1093*) (Figura 44). Estos 3 genes junto con el gen *JDM1_1094* (codifica una azúcar quinasa y un regulador transcripcional) (Tabla 9) se encuentran en una region de 3996 pb, ausente en las cepas que carecen del gen homólogo a *JDM1_1092*. Por ejemplo, en la cepa *L. plantarum* WCFS1, existe una región intergénica de 840 pb entre los genes *lp_1293* (que codifica una metalo-fosfoesterasa) y *lp_1295* (que codifica un transportador de manganeso) que carece de eso cuatro genes. En cambio, esta región si se encuentra en las cepas secuenciadas de *L. plantarum* que presentan el gen JDM1_1092 así como en las cepas secuenciadas de *Lactobacillus pentosus* (MP-10 e IG-1), una especie muy relacionada con *L. plantarum* (Perpetuini, et al., 2013). Esta región presenta dos posibles promotores, uno que precede al gen *JDM1_1091* y otro posible promotor que precede al gen *JDM1_1092*, tal y como revela el análisis de la secuencia (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html), así como también un posible terminador de la transcripción situado a 67 pb del codon de terminación del gen *JDM1_1094* (<http://rna.igmors.u-psud.fr/toolbox/arnold/>). Este posible terminador presenta una estructura formada por un tallo de 16 nucleótidos y un *loop* de 17 pb que puede funcionar como un terminador de la transcripción (Figura 44).

Tabla 9. Características de las ORF anotadas en el genoma de *L. plantarum* JDM1 en el locus de la esterase JDM1_1092

Proteínas relacionadas						Acceso Nº
Gen	Proteína deducida (aa/kDa)	Anotada como	Identidad (%)	Función propuesta	Organismo	
JDM1_1091	290/33,0	Regulador transcripcional	45,8	Regulador transpcional de la familia AraC	Lactobacillus gasseri K7	KDA99256
JDM1_1092	295/33,5	Esterasa/lipasa	57,6	α/β -hidrolasa	Lactobacillus johnsonii ATCC 33200	EEJ59204
JDM1_1093	404/43,5	Proteína transportadora Azúcar quinasa y regulador transcripcional	61,3	Principal transportador facilitador	Lactobacillus gasseri K7	KDA99258
JDM1_1094	297/31,8		49,8	Regulador transcripcional/azúcar quinasa	Lactobacillus mali KCTC 3596	EJF01557

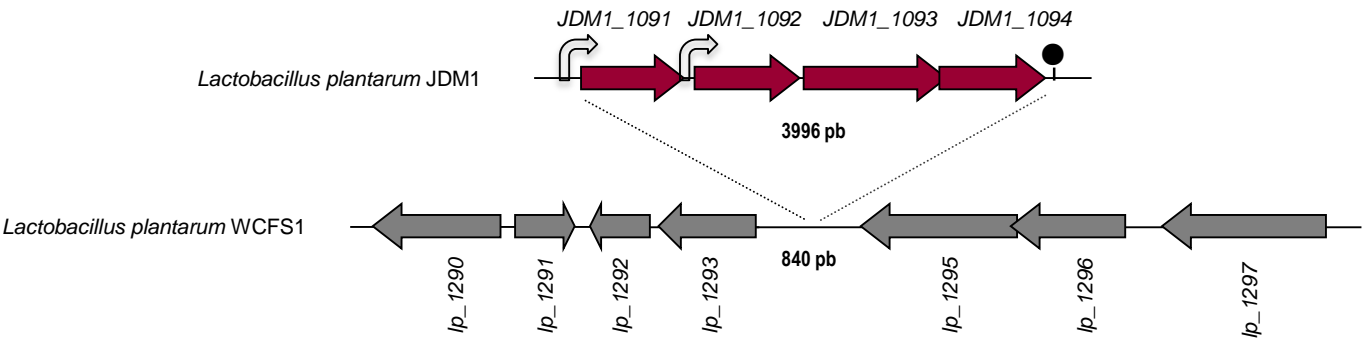
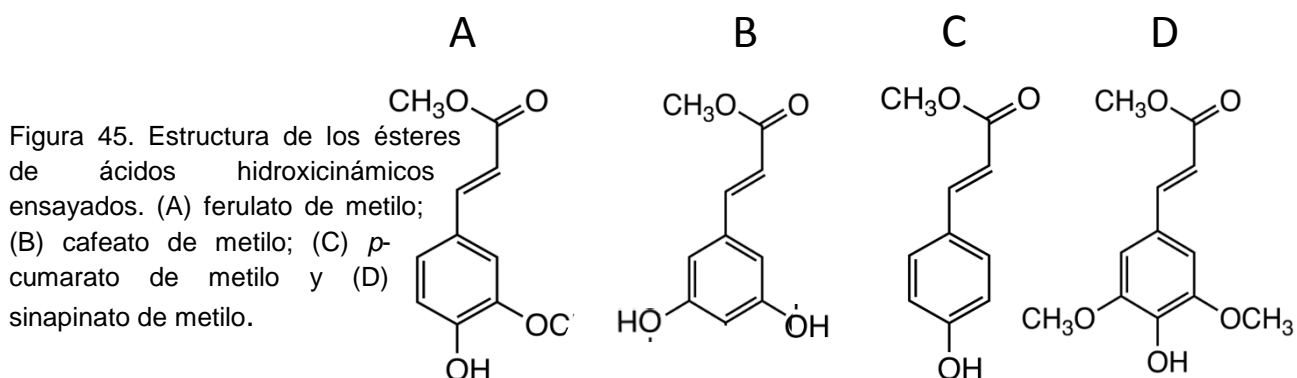


Figura 44. Organización genética de la región de inserción contigua al gen JDM1_1092 en el cromosoma de *L. plantarum* JDM1 con respecto a la cepa WCFS1 que carece de esa zona de inserción en el cromosoma. Las flechas representan los genes, la localización de los posibles promotores aparecen como flechas verticales y la región de terminación de la transcripción también se indica (bola y palito).

2.2. Metabolismo de ésteres fenólicos en cultivos de cepas de *L. plantarum*

Como se ha descrito en el apartado anterior, las cepas de *L. plantarum* presentan varios patrones de esterases diferentes al que se observó en la cepa secuenciada WCFS1. Para conocer si las cepas con un patrón de esterases diferente a la cepa WCFS1 presentan diferente capacidad para degradar ésteres de ácidos hidroxicinámicos, se seleccionaron las cepas *L. plantarum* CECT 220, CECT 221, CECT 223, CECT 224, CECT 749, DSM 1055, DSM 2648, RM28, RM35, RM71, RM73, *L. plantarum* subsp. *plantarum* CECT 748^T y *L. paraplantarum* DSM 10641. Las cepas se cultivaron en medio RPM conteniendo los sustratos tipo de feruloil esterasa, los ésteres de los ácidos hidroxicinámicos, ferulato, cafeato, *p*-cumarato y sinapinato de metilo. Después de una semana de incubación, los compuestos fenólicos producidos y presentes en el sobrenadante, se extrajeron con acetato de etilo y se analizaron mediante HPLC (Tabla 10).

Curiosamente, como se puede observar, de forma contraria a la cepa WCFS1, las cepas de *L. plantarum* CECT 220, CECT 221, CECT 223, CECT 224, DSM 1055, RM35 y RM73 presentaron actividad feruloil esterasa en cultivos. Estas cepas hidrolizaron ferulato de metilo, cafeato de metilo y *p*-cumarato de metilo posiblemente debido a la actividad de una enzima feruloil esterasa, originando los ácidos cinámicos correspondientes (Figura 46). Estos resultados son diferentes a los obtenidos anteriormente con la cepa *L. plantarum* WCFS1, la cual carecía de actividad feruloil esterasa en cultivos, siendo por lo tanto la primera vez que se observa hidrólisis de ésteres de ácidos hidroxicinámicos en cultivos de *L. plantarum*. Actividad feruloil esterasa en cultivos se ha observado previamente en otras bacterias lácticas como *L. helveticus* y *L. acidophilus* (Guglielmetti, et al., 2008).

**Tabla 10.** Degradación de ésteres de ácidos hidroxicinámicos por cepas de *L. plantarum*

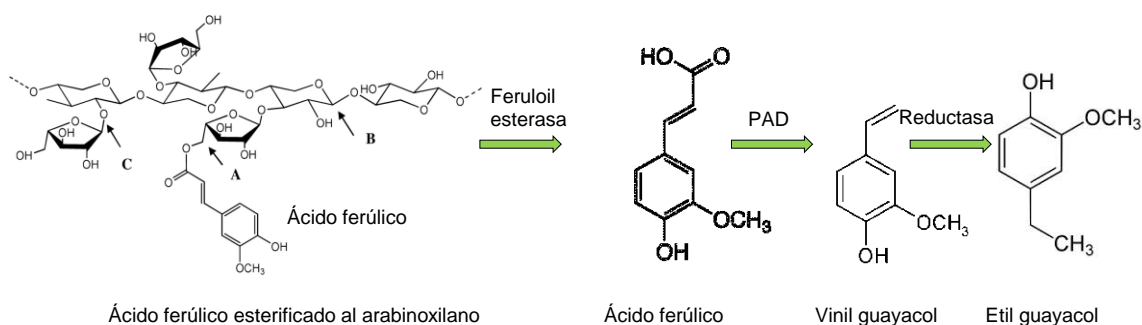
Cepa	Ferulato de metilo	Cafeato de metilo	<i>p</i> -Cumarato de metilo	Sinapinato de metilo
<i>Lactobacillus plantarum</i>				
WCFS1	-	-	-	-
CECT 220	+	+	+	-
CECT 221	+	+	+	-
CECT 223	+	+	+	-
CECT 224	+	+	+	-
CECT 748 ^T	-	-	-	-
CECT 749	-	-	-	-
DSM 1055	+	+	+	-
DSM 2648	-	-	-	-
RM28	-	-	-	-
RM35	+	+	+	-
RM71	-	-	-	-
RM73	+	+	+	-
<i>Lactobacillus paraplantarum</i>				
DSM 10641 (ATCC 10776)	-	-	-	-

L. plantarum es capaz de descarboxilar los ácidos cinámicos originados para dar lugar a los correspondientes productos vinil derivados, los cuales por acción de una reductasa se transforman en etil derivados (Tabla 11) (Rodríguez, et al., 2008) (Rodríguez, et al., 2009). Estos vinil y etil derivados son compuestos muy volátiles, por lo que son difíciles de detectar en los cromatogramas. Se ha descrito que dichos compuestos son importantes para el aroma de algunos alimentos (Rodríguez, et al., 2009).

Tabla 11. Metabolismo de ácidos fenólicos por *L. plantarum*

Ácido fenólico	Compuesto producido	Enzima implicada
Ácido p-cumárico	4-vinil fenol 4-etil fenol	PAD descarboxilasa Reductasa
Ácido cafeico	4-vinil catecol 4-etil catecol	PAD descarboxilasa Reductasa
Ácido ferúlico	4-vinil guayacol 4-etil guayacol	PAD descarboxilasa Reductasa
Ácido m-cumárico	Ácido 3-(3-hidroxifenil) propiónico	Reductasa
Ácido gálico	Pirogalol	Descarboxilasa
Ácido protocatéquico	Catecol	Descarboxilasa

Como se observa en la Tabla 11, la enzima descarboxilasa de ácidos fenólicos (PAD) de *L. plantarum*, descarboxila los ácidos *p*-cumárico, cafeico y ferúlico originando los derivados 4-vinil fenol, 4-vinil catecol y 4-vinil guayacol respectivamente (Rodríguez, et al., 2008). Posteriormente, por acción de una reductasa aun sin identificar, se generarían productos etil derivados. Por otro lado, la descarboxilación del ácido gálico (derivado del ácido benzoico) por acción de la reductasa UviD origina pirogalol que es un potente antioxidante (Jimenez, et al., 2013).

**Figura 46.** Metabolismo de ésteres fenólicos en *L. plantarum*.

Para comprobar si la actividad feruloil esterasa detectada en estas cepas se asocia a la presencia de un gen de esterasas que puede codificar la

proteína responsable de la actividad observada. Se compararon los resultados obtenidos mediante PCR (Tabla 8) con los resultados de los cultivos (Figura 47). Se observó que las cepas *L. plantarum* CECT 220, CECT 221, CECT 223, CECT 224, DSM 1055, RM35 y RM73 son las únicas que presentaron un gen homólogo a *JDM1_1092*. Este gen se incluyó en el estudio puesto que codifica una proteína anotada como “esterasa” que no se encontraba en la cepa *L. plantarum* WCFS1.

La proteína JDM1_1092 es del grupo de las alfa/beta hidrolasas y presenta alta similitud con una esterasa intracelular de *Oenococcus oeni* descrita previamente (OEOE_1573) (Sumby, et al., 2009). Teniendo en cuenta que esta proteína está presente en todas las cepas analizadas que presentan actividad feruloil esterasa, se decidió caracterizar bioquímicamente esta enzima para verificar su posible implicación en el metabolismo de ésteres aromáticos.

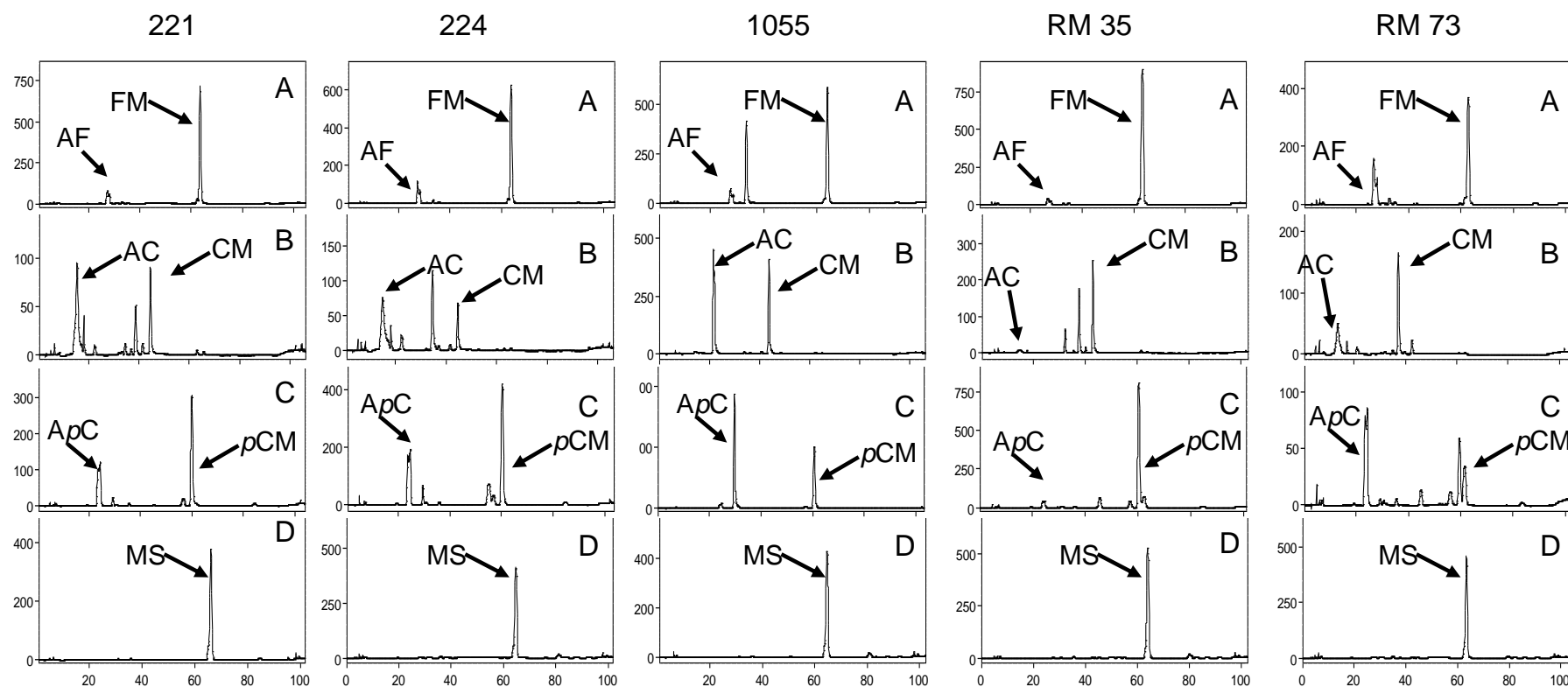


Figura 47. Análisis de la hidrólisis de ésteres de ácidos hidroxicinámicos mediante cultivos de *L. plantarum* CECT 221, CECT 224, DSM 1055, RM35 y RM73 mediante HPLC. Cultivos de *L. plantarum* en el medio RPM en presencia de 1 mM de ferulato de metilo (A), cafeato de metilo (B), *p*-cumarato de metilo (C) y sinapinato de metilo (D) a 30 °C durante 7 días. Se indica la presencia de ferulato de metilo (FM), cafeato de metilo (CM), *p*-cumarato de metilo (pCM) y sinapinato de metilo (SM), ácido ferúlico (AF), ácido cafeico (AC) y ácido *p*-cumárico (ApC). UA, unidades de absorbancia. Los cromatogramas se obtuvieron a 280 nm.

2.3. Identificación y caracterización de la feruloil esterasa JDM1_1092

En apartados anteriores se ha descrito que los extractos celulares de *L. plantarum* WCFS1 hidrolizaron ésteres de ácidos hidroxicinámicos como ferulato de metilo y *p*-cumarato de metilo y se ha caracterizado una feruloil esterasa (Lp_0796) que podría ser la responsable de dicha actividad, ya que es una proteína intracelular. Además, se ha descrito que los cultivos de otras cepas de *L. plantarum* son capaces de transformar ésteres de ácidos hidroxicinámicos como ferulato de metilo, cafeato de metilo y *p*-cumarato de metilo y se ha identificado un gen (*JDM1_1092*) presente sólo en dichas cepas.

Se realizó una búsqueda de proteínas similares en los genomas de bacterias lácticas secuenciadas mediante BLAST. Como se observa en la Figura 48, se identificaron varias proteína similares a JDM1_1092 de *L. plantarum* en *L. pentosus* (82% de identidad), *Lactobacillus vini* (64%), *L. johnsonii* (58%) y la esterasa OEOE_1573 de *O. oeni* (42%) descrita previamente.

En esta tesis se ha comprobado que los cultivos de las cepas *L. pentosus* 16366, 20199 y 20314, que presentan el gen *JDM1_1092* hidrolizaron los ésteres ferulato, cafeato y *p*-cumarato de metilo, de la misma forma que los cultivos de *L. plantarum* que presentaron una copia del gen *JDM1_1092*. Cabe destacar, que las cepas secuenciadas de *L. pentosus* presentan una proteína con un 82% de identidad con la proteína JDM1_1092 de *L. plantarum*.

155

2.3.1. Producción y caracterización de JDM1_1092

Con objeto de hiperproducir y purificar la proteína JDM1_1092 recombinante y comprobar si presenta actividad feruloil esterasa, se decidió clonar el gen *JDM1_1092* en el vector pURI3-Cter mediante la estrategia de clonación LIC. Debido a que en el laboratorio no se disponía de la cepa *L. plantarum* JDM1 ni de ninguna de las cepas secuenciadas que presentan el gen, se decidió amplificar el gen a partir de una de las cepas analizadas disponibles en el laboratorio (CECT 220, CECT 221, CECT 223, CECT 224, DSM 1055, RM35 y RM73), en las que previamente se demostró que presentaban el gen. Para ello, utilizando la secuencia de *L. plantarum* JDM1 se diseñaron los oligonucleótidos 1230 y 1231 que amplifican un fragmento de 888 pb. El fragmento se amplificó a partir de todas las cepas que presentaron el gen. La secuencia del fragmento reveló que existían dos tipos de secuencias (Figura 49). En el análisis de las secuencias se observó que las cepas *L. plantarum* CECT 220, CECT 221 y RM35 presentaban la misma secuencia que la cepa secuenciada *L. plantarum* JDM1, sin embargo las cepas CECT 223, CECT 224 y DSM 1055 contienen tres cambios de aminoácidos en las posiciones 29, 164 y 212 (Figura 49).

Finalmente, se decidió utilizar el gen *JDM1_1092* de la cepa *L. plantarum* DSM 1055, ya que en los cromatogramas se observó la mayor actividad feruloil esterasa.

Los oligonucleótidos empleados para amplificar el gen presentan unos extremos 5' que hibridan con el vector de expresión pURI3-Cter permitiendo una clonación independiente de ligación (Curiel, et al., 2011). El plásmido recombinante pURI3-Cter-1092 se propagó en la cepa de *E. coli* DH10B y una vez verificada su secuencia, se transfirió a la cepa *E. coli* BL21 (DE3) para la hiperproducción de la proteína.

En estas condiciones, se observó que la proteína se producía insoluble en cuerpos de inclusión, por lo que se co-expresó con las chaperonas GroES/GroEL para intentar conseguir la proteína en forma soluble.

La proteína recombinante se purificó en un único paso, mediante una cromatografía de afinidad a cobalto debido a la presencia de una cola de seis histidinas en su extremo C-terminal. La proteína se eluyó de la columna

mediante pH ácido utilizando el tampón Mcllvaine 150 mM a pH 5.0 (Sumbly, et al., 2009), ya que a pH 7.0 la proteína no era estable y precipitaba.

JDM1	MISKELSRSI IELRTAFKKND DARDAGL P	PREVAGVERLDNLSYGPDPKWHLLDLYRPTKV	60
220	MISKELSRSI IELRTAFKKND DARDAGL P	PREVAGVERLDNLSYGPDPKWHLLDLYRPTKV	60
221	MISKELSRSI IELRTAFKKND DARDAGL P	PREVAGVERLDNLSYGPDPKWHLLDLYRPTKV	60
RM35	MISKELSRSI IELRTAFKKND DARDAGL P	PREVAGVERLDNLSYGPDPKWHLLDLYRPTKV	60
223	MISKELSRSI IELRTAFKKND DARDAGL P	PREVAGVERLDNLSYGPDPKWHLLDLYRPTKV	60
224	MISKELSRSI IELRTAFKKND DARDAGL P	PREVAGVERLDNLSYGPDPKWHLLDLYRPTKV	60
1055	MISKELSRSI IELRTAFKKND DARDAGL P	PREVAGVERLDNLSYGPDPKWHLLDLYRPTKV	60
	*****	*****	
JDM1	IKPLPVI INIHGGGWCYGTKETYQFYGLNWAQRGFAFVNPNYRLAPDVT	FPGELDDVDRY	120
220	IKPLPVI INIHGGGWCYGTKETYQFYGLNWAQRGFAFVNPNYRLAPDVT	FPGELDDVDRY	120
221	IKPLPVI INIHGGGWCYGTKETYQFYGLNWAQRGFAFVNPNYRLAPDVT	FPGELDDVDRY	120
RM35	IKPLPVI INIHGGGWCYGTKETYQFYGLNWAQRGFAFVNPNYRLAPDVT	FPGELDDVDRY	120
223	IKPLPVI INIHGGGWCYGTKETYQFYGLNWAQRGFAFVNPNYRLAPDVT	FPGELDDVDRY	120
224	IKPLPVI INIHGGGWCYGTKETYQFYGLNWAQRGFAFVNPNYRLAPDVT	FPGELDDVDRY	120
1055	IKPLPVI INIHGGGWCYGTKETYQFYGLNWAQRGFAFVNPNYRLAPDVT	FPGELDDVDRY	120
	*****	*****	
JDM1	IHWVAEHAAEYNLDSNNVFLIGDSAGGEMAEQYATILTNPEYRS	KFGYELTNLKFRVAVL	180
220	IHWVAEHAAEYNLDSNNVFLIGDSAGGEMAEQYATILTNPEYRS	KFGYELTNLKFRVAVL	180
221	IHWVAEHAAEYNLDSNNVFLIGDSAGGEMAEQYATILTNPEYRS	KFGYELTNLKFRVAVL	180
RM35	IHWVAEHAAEYNLDSNNVFLIGDSAGGEMAEQYATILTNPEYRS	KFGYELTNLKFRVAVL	180
223	IHWVAEHAAEYNLDSNNVFLIGDSAGGEMAEQYATILTNPEYRS	KFGYELTNLKFRVAVL	180
224	IHWVAEHAAEYNLDSNNVFLIGDSAGGEMAEQYATILTNPEYRS	KFGYELTNLKFRVAVL	180
1055	IHWVAEHAAEYNLDSNNVFLIGDSAGGEMAEQYATILTNPEYRS	KFGYELTNLKFRVAVL	180
	*****	*****	
JDM1	NSAAAFPLDEGMVTGAVAAFTPSIIRQQRE	QIMAENYIQKNYLPFTFICTATADFLRNNA	240
220	NSAAAFPLDEGMVTGAVAAFTPSIIRQQRE	QIMAENYIQKNYLPFTFICTATADFLRNNA	240
221	NSAAAFPLDEGMVTGAVAAFTPSIIRQQRE	QIMAENYIQKNYLPFTFICTATADFLRNNA	240
RM35	NSAAAFPLDEGMVTGAVAAFTPSIIRQQRE	QIMAENYIQKNYLPFTFICTATADFLRNNA	240
223	NSAAAFPLDEGMVTGAVAAFTPSIIRQQRE	QIMAENYIQKNYLPFTFICTATADFLRNNA	240
224	NSAAAFPLDEGMVTGAVAAFTPSIIRQQRE	QIMAENYIQKNYLPFTFICTATADFLRNNA	240
1055	NSAAAFPLDEGMVTGAVAAFTPSIIRQQRE	QIMAENYIQKNYLPFTFICTATADFLRNNA	240
	*****	*****	
JDM1	AKLDGFLTAKKVEHVFKMYGDDDHPRGHVFLISQKDELAQQATDDEMRFLQEHMA		295
220	AKLDGFLTAKKVEHVFKMYGDDDHPRGHVFLISQKDELAQQATDDEMRFLQEHMA		295
221	AKLDGFLTAKKVEHVFKMYGDDDHPRGHVFLISQKDELAQQATDDEMRFLQEHMA		295
RM35	AKLDGFLTAKKVEHVFKMYGDDDHPRGHVFLISQKDELAQQATDDEMRFLQEHMA		295
223	AKLDGFLTAKKVEHVFKMYGDDDHPRGHVFLISQKDELAQQATDDEMRFLQEHMA		295
224	AKLDGFLTAKKVEHVFKMYGDDDHPRGHVFLISQKDELAQQATDDEMRFLQEHMA		295
1055	AKLDGFLTAKKVEHVFKMYGDDDHPRGHVFLISQKDELAQQATDDEMRFLQEHMA		295
	*****	*****	

Figura 49. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la proteína equivalente a JDM1_1092 de las cepas *L. plantarum* JDM1, CECT 220, CECT 221, CECT 223, CECT 224, DSM 1055, RM35 y RM73. Se llevó a cabo un alineamiento múltiple de secuencias utilizando el programa Clustal Omega. (*) identidad entre aminoácidos, (:) cambio semiconservativo y (.) cambio conservativo. Se representan sombreados en verde y amarillo los tres cambios de aminoácidos.

Una vez purificada la proteína recombinante, se realizó una electroforesis en geles SDS-PAGE para comprobar la hiperproducción de la enzima en los transformantes de *E. coli*. En la Figura 50 se puede comprobar

que, tanto en el extracto soluble procedente de las células de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con el plásmido pURI3-Cter-1092 como en las diferentes fracciones eluídas de la columna de afinidad, aparece la proteína JDM1_1092 recombinante con un tamaño aproximado de 33 kDa.

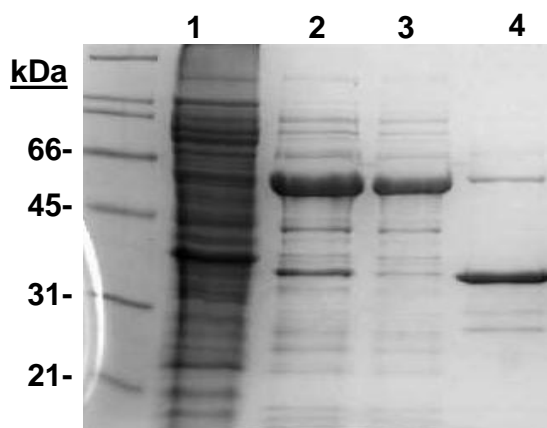


Figura 50. Hiperproducción y purificación de la proteína JDM1_1092 recombinante de *L. plantarum* DSM 1055. 1, extracto proteico soluble procedente de células inducidas con IPTG *E. coli* BL21 (DE3) (pURI3-Cter); 2, extracto proteico soluble de células *E. coli* BL21 (DE3) (pURI3-Cter-1092); 3, fracción eluída no retenida en la resina de afinidad; 4 fracción eluída de la columna de afinidad a pH 5. Gel SDS-PAGE 12,5% de acrilamida. El marcador de peso molecular *Broad-Range* (Bio-Rad), está representado a la izquierda.

Para conocer la especificidad de sustrato de la enzima JDM1_1092 de *L. plantarum* DSM 1055 se ensayó la actividad esterasa frente a ésteres de *p*-nitrofenilo de distinta longitud de la cadena acilo (C2-C16). La esterasa JDM1_1092 fue activa en todos los sustratos ensayados, presentado máxima actividad sobre butirato de *p*-nitrofenilo, aunque también hidrolizó eficazmente palmitato de *p*-nitrofenilo (Figura 51). Estos resultados indicarían que JDM1_1092 presenta actividad lipasa. Para conocer con más detalle el rango de sustratos que hidroliza esta esterasa, se ensayó la actividad sobre una librería de ésteres, en la que se incluyeron entre otros, ésteres aromáticos como los sustratos de feruloil esterases y de tanasas. Como se observa en la Figura 51, JDM1_1092 hidrolizó eficazmente los ésteres de los ácidos hidroxycinámicos estudiados (ferulato de metilo, cafeato de metilo, *p*-cumarato de metilo y sinapinato de metilo), pero además presentó actividad sobre

ésteres del ácido gálico como galato de metilo, de etilo y de propilo no actuando sobre triglicéridos. Estos resultados confirman que la esterasa JDM1_1092 es una feruloil esterasa que además presenta actividad tanasa. Esto es una actividad muy interesante, ya que se trata de una proteína que actúa sobre ésteres de distintos ácidos fenólicos, la cual no se ha descrito en otras esterasas de bacterias lácticas descritas previamente.

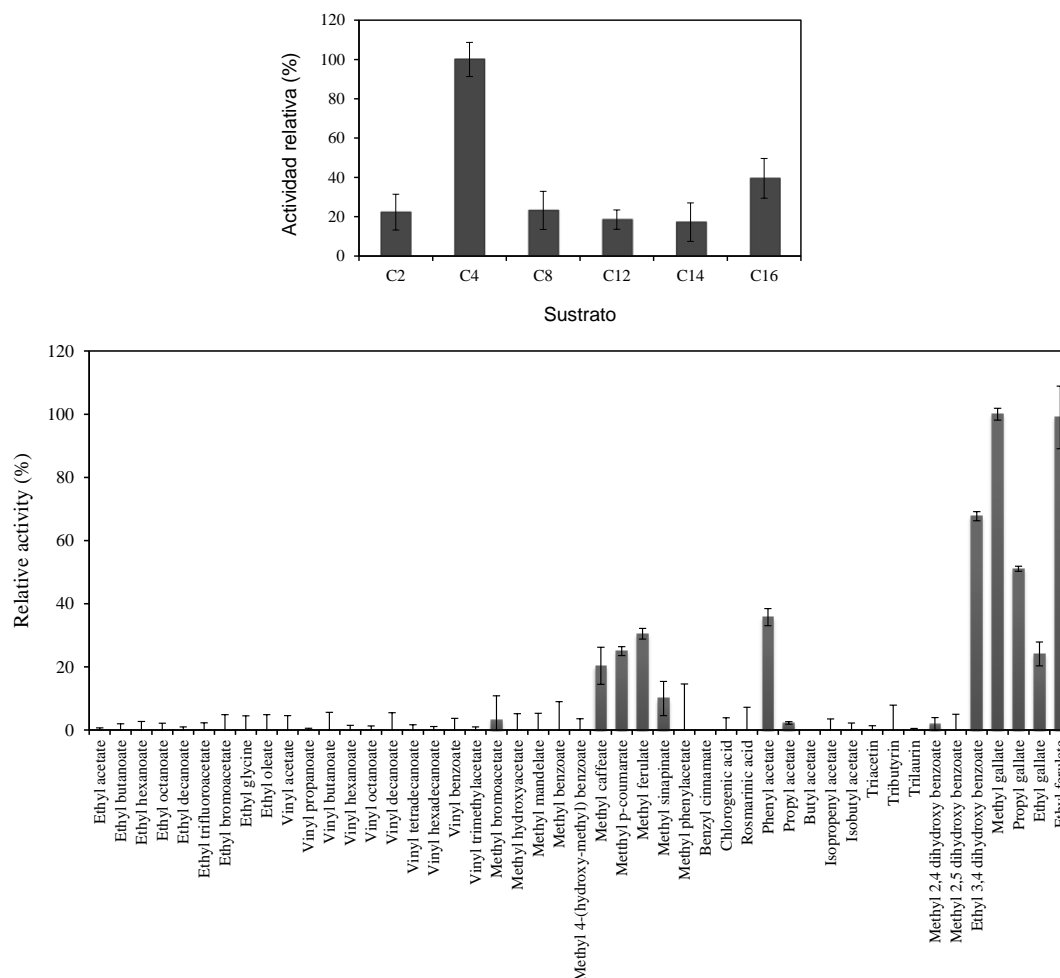


Figura 51. Especificidad de sustrato de JDM1_1092 frente a (A) sustratos cromogénicos (ésteres de *p*-nitrofenilo) con diferente longitud de la cadena acilo (C₂, acetato; C₄, butirato; C₈, caprilato; C₁₂, laurato; C₁₄, miristato; C₁₆, palmitato) o (B) hacia una librería general de ésteres. Se representa la actividad relativa obtenida con los diferentes sustratos. Las barras de error representan la desviación estándar estimada de tres ensayos independientes. La máxima actividad obtenida se definió como el 100%.

Para confirmar estos resultados y con objeto de analizar la especificidad de sustrato de la esterasa JDM1_1092 pura de *L. plantarum* DSM 1055 se ensayó su actividad frente a 30 ésteres derivados de ácidos fenólicos y el

resultado de la hidrólisis se analizó mediante HPLC (Tabla 12).

Los ácidos benzoicos y cinámicos generalmente se encuentran presentes en alimentos y en ocasiones son componentes de estructuras complejas como ligninas y taninos hidrolizables. Se estudiaron ésteres derivados de los ácidos gálico, salicílico, benzoico, gentísico, 4-hidroxibenzoico, protocatéquico y vainillínico, ácido *p*-cumárico, ácido cinámico, ácido cafeico, ácido ferúlico y ácido sinápico, cuya estructura se representa en la Figura 52. Como se observa en la Tabla 12, entre los ácidos benzoicos probados, la esterasa JDM1_1092 hidrolizó la mayoría de ellos excepto el galato de laurilo, salicilato de metilo, gentisato de metilo, ácido elágico y ácido tánico. Parece ser que los sustratos con un grupo –OH en posición 1 como los ésteres de los ácidos salicílico y gentísico no son hidrolizados, así como tampoco los ésteres con un grupo alcohol grande como el laurilo, debido probablemente a impedimentos estéricos. Estos impedimentos estéricos pueden explicar que no hidrolice taninos complejos naturales como el ácido tánico o el ácido elágico, aunque si actuó sobre galato de epicatequina. Respecto a los ácidos cinámicos estudiados, metabolizó todos los ensayados excepto los ácidos clorogénico y rosmarínico. La Figura 52 muestra los cromatogramas de HPLC obtenidos con los distintos ésteres, en comparación con los cromatogramas de los controles correspondientes que se representan en la Figura 53. La hidrólisis de estos ésteres genera los ácidos benzoicos o cinámicos correspondientes.

Tabla 12. Actividad esterasa de JDM1_1092 de *L. plantarum* DSM 1055 sobre los ésteres derivados de ácidos fenólicos ensayados.

Ácido fenólico	Ésteres derivados	Hidrólisis
Ácido gálico	Galato de metilo	+
	Galato de etilo	+
	Galato de propilo	+
	Galato de laurilo	–
Ácido benzoico	Benzoato de metilo	+
	Benzoato de etilo	+
	Benzoato de vinilo	+
Ácido 4-hidroxibenzoico	4-hidroxibenzoato de metilo	+
	4-hidroxibenzoato de etilo	+
Ácido vanílico	Vanillato de metilo	+
Ácido dihidroxibenzoico	2,4-dihidroxibenzoato de metilo	+
	3,4-dihidroxibenzoato de etilo (protocatecuato de etilo)	+
	2,5-dihidroxibenzoato de metilo	+
	3,5-dihidroxibenzoato de etilo	+
Ácido gentísico	Gentisato de metilo	
Ácido salicílico	Salicilato de metilo	–
Ácido p-cumárico	p-cumarato de metilo	+
Ácido cafeico	Cafeato de metilo	+
Ácido ferúlico	Ferulato de metilo	+
	Ferulato de etilo	+
Ácido sinápico	Sinapato de metilo	+
Ácido clorogénico		–
Ácido rosmarínico		–
Ácido elágico		–
Ácido tánico		–
Galato de epicatequina		+

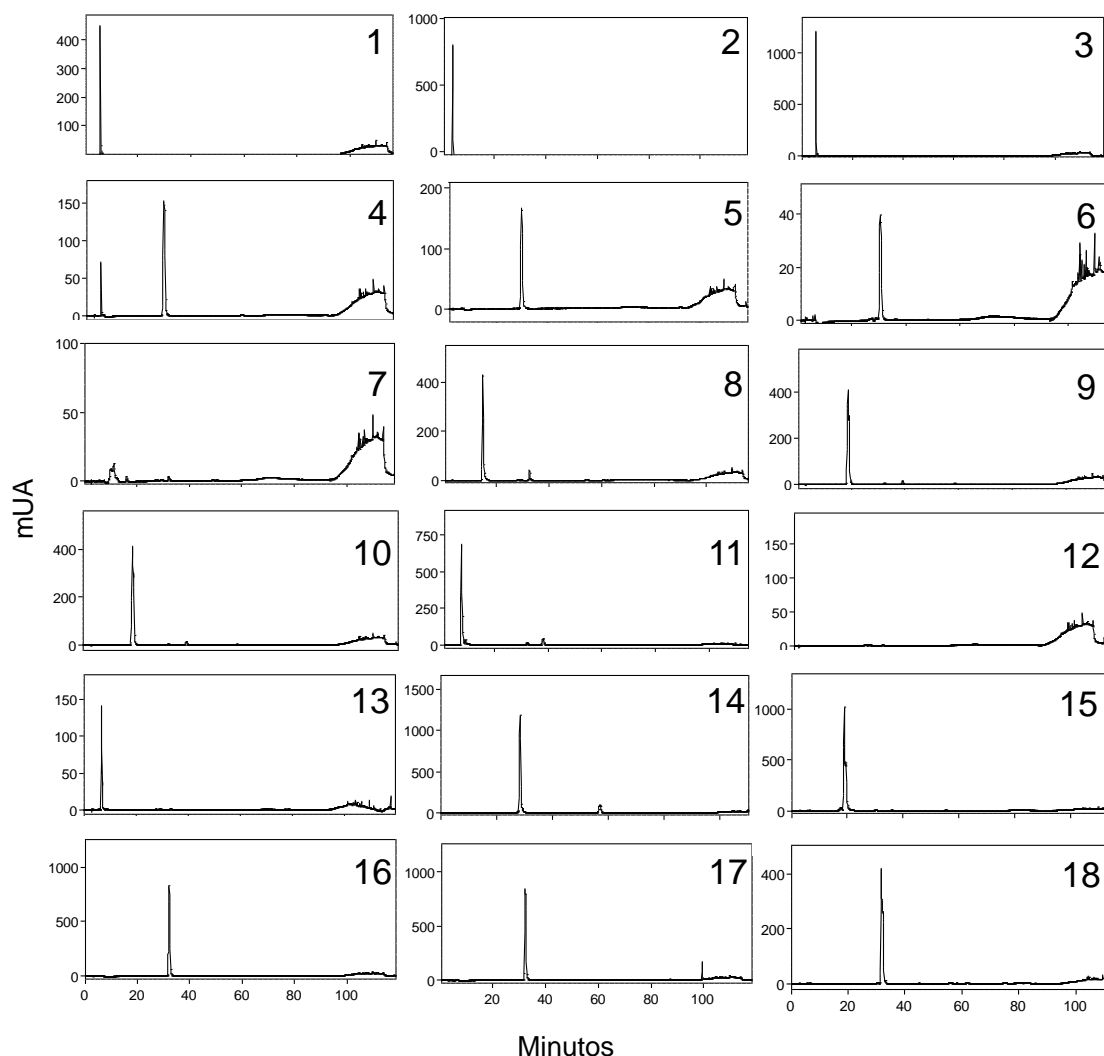


Figura 52. Hidrólisis de los ésteres derivados de los ácidos fenólicos por la feruloil esterasa JDM1_1092 de *L. plantarum* 1055. Galato de metilo (1), galato de etilo (2), galato de propilo (3), benzoato de metilo (4), benzoato de etilo (5), benzoato de vinilo (6), 4-hidroxibenzoato de metilo (7), 4-hidroxibenzoato de etilo (8), vanillato de metilo (9), 2,4-dihidroxibenzoato de metilo (10), 3,4-dihidroxibenzoato de etilo (11), 2,5-dihidroxibenzoato de metilo (12), 3,5-dihidroxibenzoato de etilo, (13), *p*-cumarato de metilo (14), cafeato de metilo (15), ferulato de metilo (16), ferulato de etilo (17), sinapinato de metilo (18).

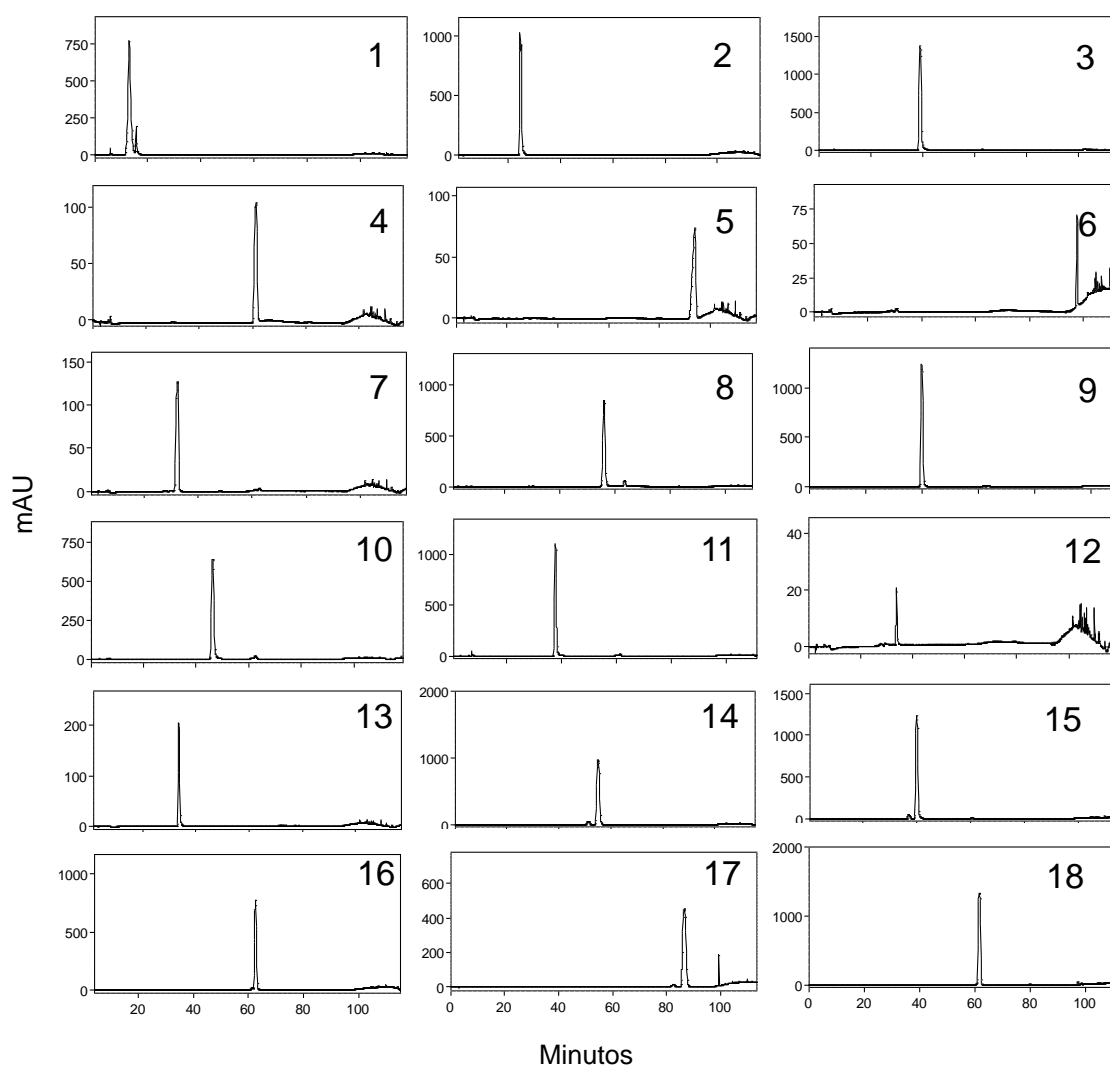


Figura 53. Controles de Hidrólisis de los ésteres derivados de los ácidos. Galato de metilo (1), galato de etilo (2), galato de propilo (3), benzoato de metilo (4), benzoato de etilo (5), benzoato de vinilo (6), 4-hidroxibenzoato de metilo (7), 4-hidroxibenzoato de etilo (8), vanillato de metilo (9), 2,4-dihidroxibenzoato de metilo (10), 3,4-dihidroxibenzoato de etilo (11), 2,5-dihidroxibenzoato de metilo (12), 3,5-dihidroxibenzoato de etilo, (13), *p*-cumarato de metilo (14), cafeato de metilo (15), ferulato de metilo (16), ferulato de etilo (17), sinapinato de metilo (18).

Teniendo en cuenta el perfil de actividad observado, JDM1_1092 es una feruloil esterasa de tipo C, ya que hidroliza los cuatro ésteres de metilo de los ácidos hidroxicinámicos generalmente utilizados como modelo. Además, representaría una familia nueva de enzimas puesto que además presentó actividad tanasa y metabolizó la mayoría de los ésteres de ácidos fenólicos ensayados. Hasta la fecha sólo se ha descrito una proteína que presenta

simultáneamente actividad feruloil esterasa y tanasa, la cual se ha aislado de una librería metagenómica de suelo y presentó actividad sobre ferulato de etilo, cafeato de metilo, *p*-cumarato de metilo, galato de metilo, ácido tánico, galato de epicatequina y galato de epigallocatequina galato (Yao, et al., 2011). Por lo tanto, JDM1_1092 es la esterasa descrita hasta la fecha capaz de metabolizar el mayor rango de ésteres de ácidos aromáticos, lo que le confiere un potencial uso en la industria, para la producción de compuestos bioactivos como ácido cafeico, ácido ferúlico y ácido gálico, los cuales presentan varias aplicaciones biotecnológicas (Yao, et al., 2011). La feruloil esterasa Lp_0796 de *L. plantarum* WCFS1 descrita en esta tesis presentó también actividad sobre los cuatro sustratos modelo de feruloil esterases, pero no actuó sobre otros ésteres de ácidos hidroxibenzoicos. Igual que en el caso de Lp_0796, el perfil de actividad sobre los ésteres de ácidos hidroxicinámicos observado en los cultivos de las cepas de *L. plantarum* que presentan la proteína JDM1_1092 no corresponde con el observado para la proteína pura. Los cultivos de dichas cepas no hidrolizaron sinapinato de metilo, lo cual podría deberse a que la enzima presenta menos actividad sobre dicho sustrato. Teniendo en cuenta que se observó actividad feruloil esterasa en los cultivos, en un principio se pensó que la enzima JDM1_1092 sería una enzima extracelular, pero al analizar la secuencia peptídica de la proteína JDM1_1092 se observó que ésta es intracelular, ya que carece de secuencia péptido señal. Otra posibilidad es que las cepas que hidrolizaron ésteres de ácidos hidroxicinámicos en cultivos presenten un transporte eficaz de dichos sustratos al interior celular. Como se ha comentado anteriormente, todas las cepas con actividad feruloil esterasa en cultivos presentan el gen *JDM1_1093* contiguo y *upstream* al gen que codifica la feruloil esterasa (JDM1_1092) que codifica una proteína transportadora. Por lo que esta proteína transportadora pudiera ser responsable de la introducción de ésteres de ácidos hidroxicinámicos al interior celular. El análisis de la secuencia aminoacídica del transportador se observó que presenta motivos conservados de la superfamilia de transportadores MFS, de sus siglas en inglés *Major Facilitator Superfamily*. Esta familia de transportadores es un grupo muy grande y diversos de transportadores secundarios que se encuentra distribuida en todos los reinos (Madej, et al., 2013). Las proteínas MFS llevan a cabo el transporte a través de la membrana

citoplásmica o interna de un amplio rango de sustratos incluyendo azúcares, aminas, aminoácidos, péptidos y antibióticos mediante un mecanismo simporte utilizando un gradiente electroquímico de protones (Madej, et al., 2013). Estas proteínas típicamente presentan una longitud de 400 a 600 aminoácidos (JDM1_1093 404 aminoácidos), generalmente contienen 12 hélices α transmembrana y se han asociado con la resistencia a antibióticos y con quimiotaxis (Nogales, et al., 2011). En *Pseudomonas putida* se ha descrito que un transportador de la superfamilia MFS está implicado en el transporte de compuestos fenólicos como el ácido gálico (Nogales, et al., 2011) y 4-hidroxibenzoato (Ditty y Harwood, 2002).

Una vez confirmado que la feruloil esterasa JDM1_1092 presenta actividad tanasa se estudió su actividad específica mediante el ensayo colorimétrico con rodanina utilizando como sustrato el galato de metilo, en tampón fosfato 50 mM pH 6,5. La enzima tanasa puede catalizar la hidrólisis de los enlaces éster presentes en galotaninos, taninos hidrolizables y ésteres de ácido gálico (Lekha y Lonsane, 1997). El ensayo colorimétrico con rodanina es un método específico para la detección de ácido gálico. La rodanina reacciona con el grupo hidroxilo del ácido gálico dando lugar a un producto de color púrpura intenso con un máximo de absorbancia a 520 nm. Mediante el procedimiento descrito, JDM1_1092 presentó una actividad específica de 25 U/mg, definiéndose 1 unidad como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μ mol de ácido gálico por minuto. Esta actividad específica es significativamente menor (16 veces) que la presentada por la tanasa TanB_{Lp} de *L. plantarum* ATCC 14917^T, que fue de 440 U/mg y se tomó como referencia. Recientemente se ha descrito una nueva tanasa, TanA_{Lp} de *L. plantarum* ATCC 14917^T, que se encuentra sólo en algunas cepas de *L. plantarum* y que presentó una actividad específica de 39 U/mg (Jimenez, et al., 2014), un 36% más de actividad que la feruloil esterasa JDM1_1092. También se han descrito recientemente tanasas en otras especies como TanSg1, de *Streptococcus gallolyticus* UCN34, la cual presenta una elevada similitud con TanB_{Lp} de *L.*

plantarum y que presenta una actividad específica de 577 U/mg (Jimenez, et al., 2014) y la tanasa de *Atopobium parvulum*, TanA_{Ap}, que presentó una actividad específica de 3,5 U/mg, siendo la que presentó menor actividad específica entre las tanasas bacterianas descritas. Estos resultados indican que entre las tanasas bacterianas descritas, JDM1_1092 presentó una actividad similar a la tanasa TanA_{Lp} de *L. plantarum*.

Teniendo en cuenta que la feruloil esterasa JDM1_1092 de *L. plantarum* DSM 1055 metabolizó un amplio rango de ésteres aromáticos, por lo que podría ser una enzima muy útil en biotecnología, se decidió realizar una caracterización bioquímica exhaustiva. Para determinar las propiedades bioquímicas más relevantes se utilizó butirato de *p*-nitrofenilo como sustrato, siguiendo la absorbancia a 348 nm. La proteína presentó una actividad específica de 25 U/mg en las condiciones descritas. JDM1_1092 presentó un pH óptimo de 5,0 para la hidrólisis de butirato de *p*-nitrofenilo (Figura 54A). Con respecto a la temperatura, la feruloil esterasa JDM1_1092 presentó la actividad máxima a 30 °C, aunque a 5-20 °C presentó aproximadamente un 90% de actividad y a 45 °C un 40% (Figura 54B). Las esterasas descritas previamente de bacterias lácticas no presentan un pH óptimo ácido excepto la esterasa Est28 de *O. oeni* (Sumbay, et al., 2009) y la feruloil esterasa de *L. acidophilus* que presentó un pH óptimo de 5,6 (Wang, et al., 2004). Por el contrario, las feruloil esterasas de *L. johnsonni* presentan un pH óptimo de 7,8 y 6,7 (Lai, et al., 2009) y la feruloil esterasa Lp_0796 de *L. plantarum* descrita en esta tesis presentó un pH óptimo de 7,0. Todas las arilesterasas de *L. plantarum* WCFS1 descritas en esta tesis presentan la máxima actividad a pH neutro, sin embargo Lp_1002 presenta actividad óptima en el rango de pH de 5 a 7, por lo que esta proteína junto con JDM1_1092 presenta un pH óptimo ácido.

La feruloil esterasa con actividad tanasa aislada de una librería metagenómica presentó un pH óptimo de 7,0 (Yao, et al., 2011), al igual que la tanasa TanA de *L. plantarum* (Curiel, et al., 2009), mientras que TanB_{Lp} de *L. plantarum* presentó un pH óptimo de 6 (Jiménez et al., 2014). La temperatura óptima que presentó JDM1_1092 coincide con la que presentaron las feruloil esterasas de *L. johnsonni*, Lp_0796 de *L. plantarum* y la tanasa TanB de *L.*

plantarum y el rango de actividad presentado por la feruloil esterasa con actividad tanasa Tan410 (Yao et al., 2014). Respecto a la termoestabilidad de la proteína, se comprobó que la feruloil esterasa JDM1_1092 es estable durante las incubaciones a temperaturas hasta 37 °C. A temperaturas superiores mantuvo el 40% de actividad residual en incubaciones prolongadas (Figura 54C). La feruloil esterasa de *L. acidophilus* presentó una termoestabilidad similar a JDM1_1092, aunque a temperaturas altas fue más inestable. Por el contrario Tan410 fue más termoestable.

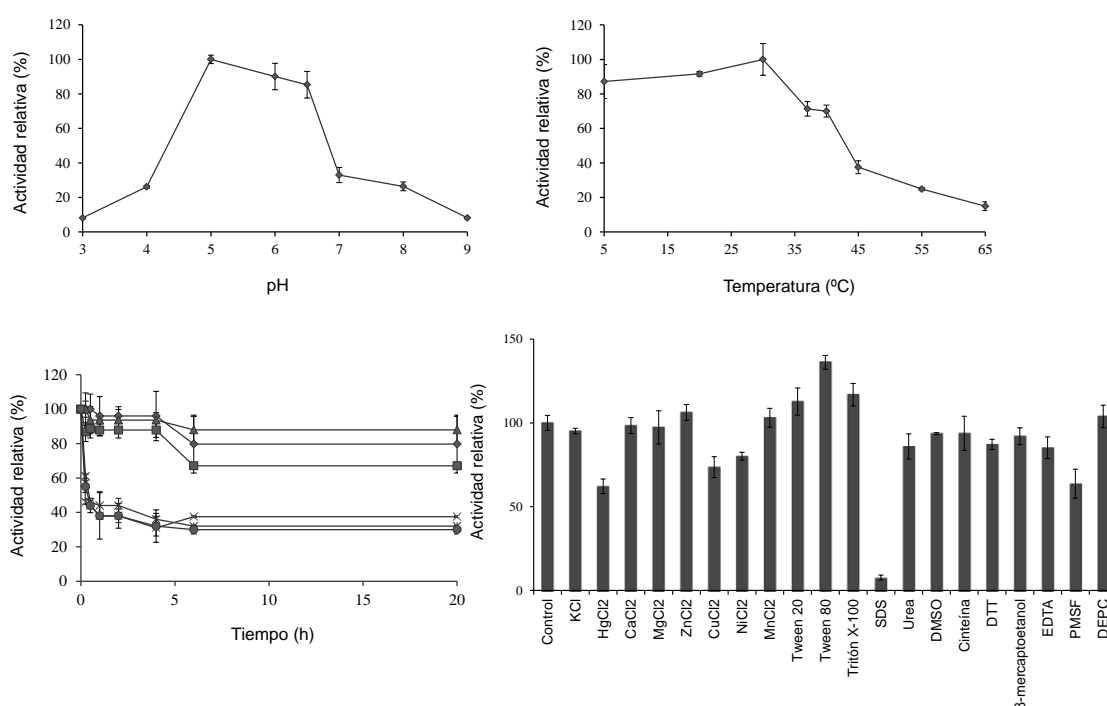


Figura 54. Caracterización de la feruloil esterasa JDM1_1092 de *L. plantarum* DSM 1055. (A) Efecto del pH en la actividad (las reacciones con la enzima se llevaron a cabo en un rango de pH entre 3.0 y 9.0). (B) Efecto de la temperatura en la actividad (las reacciones se incubaron en un intervalo de temperatura entre 5 y 65 °C). (C) Estabilidad térmica. La enzima se incubó a 25 °C (●), 30 °C (○), 37 °C (△) y 45 °C (×) en tampón McIlvaine 50 mM pH 5.0. (D) Efecto de iones y aditivos en la actividad enzimática. Los experimentos se realizaron por triplicado. Se representa la media y la desviación estándar. La máxima actividad observada se consideró el 100% de actividad.

Además, se evaluó el efecto de distintos aditivos sobre la actividad enzimática de la feruloil esterasa JDM1_1092 (Figura 54D). Como se puede observar, detergentes como Tween 20 y Tween 80 y Tritón X-100 incrementaron la actividad de la enzima levemente, obteniéndose resultados

similares en la feruloil esterasa Lp_0796 descrita en esta tesis y en una arilesterasa de la familia SGNH aislada del rumen de cabra (Wang et al., 2011). Otros detergentes como el SDS presentaron un efecto desnaturalizante sobre la enzima, ya que redujo la actividad un 86% y también se inhibió en presencia de los cationes Hg^{2+} y Cu^{2+} . La actividad de JDM1_1092 disminuyó en presencia de PMSF, al igual que las feruloil esterasa de *L. johnsonii* (Lai et al., 2009), lo que confirma la presencia de serina en el centro activo formando parte de la triada catalítica.

2.3.2. Expresión heteróloga de JDM1_1092 en *L. lactis* y *L. plantarum*

En esta tesis se han identificado dos proteínas de *L. plantarum* que poseen actividad feruloil esterasa, la proteína Lp_0796 presente en todas las cepas de *L. plantarum* analizadas, y la proteína JDM1_1092 presente sólo en algunas cepas. El determinar una actividad específica de una proteína no prueba, sin embargo, que esa sea la reacción catalizada por la enzima en la célula. Con objeto de analizar *in vivo* la actividad de las proteínas con actividad feruloil esterases identificadas, se decidió interrumpir los genes que las codifican y analizar los efectos de la interrupción en el fenotipo de *L. plantarum*. La interrupción de dichos genes se llevó a cabo mediante la inserción de un plásmido no replicativo en el cromosoma de *L. plantarum*. Para ello se clonó en el plásmido pUCE191 un fragmento interno del gen *lp_0796* (0796*) amplificado con los oligonucleótidos 1387 y 1388 y del gen *JDM1_1092* (1092*) amplificado mediante los oligonucleótidos 878 y 879 (Arrecubieta *et al.*, 1995). Una vez contruidos los plásmidos pUCE191-0796* y pUCE191-1092* se llevó a cabo la transformación de *L. plantarum* WCFS1 mediante el protocolo descrito por Aukrust y Blom (1992).

Después de realizar varios intentos de transformación en las cepas de *L. plantarum* que presentaron copia del gen *JDM1_1092* (CECT 220, CECT 221, CECT 223, CECT 224, DSM 1055, RM35 y RM73) con los plásmidos recombinantes derivados del vector pUCE191, no se consiguió ninguna colonia en ninguna de las cepas de *L. plantarum* transformada, lo que parece indicar que en estas cepas no se conseguía un grado de competencia suficiente para llevar a cabo la integración de plásmidos no replicativos. En la cepa *L.*

plantarum WCFS1 si se consiguió una competencia suficiente para que los plásmidos no replicativos se integren en el cromosoma, por ello se produjo la recombinación homóloga entre el fragmento interno, 0796*, clonado en el plásmido pUCE191 y la copia del gen *lp_0796* presente en el cromosoma de *L. plantarum* WCFS1, lo que ocasionó la interrupción del gen mediante la integración del plásmido en su copia cromosómica. La correcta integración del plásmido, interrumpiendo el gen *lp_0796*, se comprobó mediante PCR utilizando un oligonucleótido que hibrida en el plásmido (oligonucleótido 1224) y otro oligonucleótido que hibrida en el gen *lp_0796*, pero en una región externa al fragmento 0796* (oligonucleótido 704). Una vez comprobada la correcta interrupción del gen *lp_0796* en el cromosoma de *L. plantarum* WCFS1, se estudió el efecto de la interrupción en la actividad feruloil esterasa de *L. plantarum* WCFS1. Teniendo en cuenta que los extractos celulares de *L. plantarum* WCFS1 hidrolizaron parcialmente *p*-cumarato de metilo y ferulato de metilo, se incubaron los extractos de la cepa silvestre y de la cepa mutante en presencia de dichos compuestos durante 16 horas. Terminada la incubación, los compuestos fenólicos se extrajeron con acetato de etilo y se analizaron mediante HPLC (dato no mostrado). La interrupción del gen *lp_0796* no produjo ningún efecto aparente en el metabolismo de ésteres hidroxicinámicos, ya que los extractos de *L. plantarum* WCFS1 (pUCE191-0796*) hidrolizaron parcialmente dichos sustratos, al igual que la cepa salvaje. Esto se puede deber a la presencia de otras proteínas con actividad feruloil esterasa similar a *Lp_0796*, quedando enmascarado el efecto de la interrupción por la actividad de dichas proteínas. *L. plantarum* WCFS1 presenta las proteínas intracelulares *Lp_2953* y *Lp_2960* anotadas como esterasas y que se encuentran en una región implicada en la hidrólisis de galotinos presentes en sustratos vegetales, próximas a la enzima tanasa (*Lp_2956*) y descarboxilasa (*Lp_2945*) (Jimenez, et al., 2013). Dichas esterasas no se han podido hiperproducir eficazmente y teniendo en cuenta su localización en el genoma podría esperarse que estuvieran también implicadas en el metabolismos de compuestos fenólicos en *L. plantarum*, aunque no se descarta que la actividad feruloil esterasa intracelular se deba a otras proteínas.

Para identificar la función *in vivo* de la proteína JDM1_1092, teniendo en cuenta que no fue posible la interrupción del gen que la codifica en las cepas que lo presentaban, se realizó un ensayo de complementación. De esta forma, se estudió el efecto de la presencia de la proteína en cepas que no presentan actividad feruloil esterasa en cultivos como *Lactococcus lactis* MG1363, empleando el plásmido replicativo en bacterias Gram+ pNZ:TuR, derivado del plásmido PNZ8048 que presenta como promotor el factor de elongación Tu de *Lactobacillus reuteri*. Para ello se clonó el gen JDM1_1092 en el vector pNZ:Tu bajo el control de un promotor constitutivo fuerte (TuR). Las células de *L. lactis* MG1363 se transformaron con el plásmido recombinante pNZ:TuR-1092. Una vez comprobado mediante PCR la presencia del gen JDM1_1092 en los transformantes de *L. lactis*, las células obtenidas se cultivaron en medio M17G en presencia de los cuatro sustratos modelo de feruloil esteraras, así como también en presencia de galato de metilo y protocatecuato de etilo, durante 7 días. Terminada la incubación, los compuestos fenólicos se extrajeron con acetato de etilo y se analizaron mediante HPLC (Figura 55).

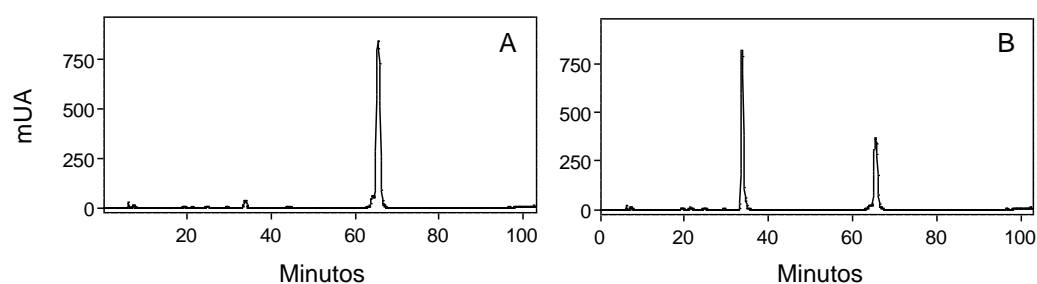


Figura 55. Análisis de la hidrólisis de ferulato de metilo mediante cultivos de la cepa salvaje *L. plantarum* 1055 (A) y de la cepa *L. plantarum* 1055 pNZ:Tu-1092 (B). UA, unidades de absorbancia.

En la Figura 55, se observa que *L. lactis* MG1363 (pNZ:TuR-1092) hidrolizó eficazmente los ésteres de ácidos hidroxicinámicos presentes en el medio de cultivo, así como también, aunque en menor medida, el galato de metilo y protocatecuato de etilo, demostrándose así que el gen JDM1_1092 es un gen que codifica una enzima con actividad feruloil esterasa y tanasa que

confiere dicha actividad a las cepas que lo presentan. Aunque en los cromatogramas de la cepa *L. lactis* MG1363 se observó una actividad residual sobre ferulato de metilo, cafeato de metilo y *p*-cumarato de metilo. Los cultivos que expresaron la proteína JDM1_1092 presentaron mayor actividad feruloil esterasa que tanasa, que los ésteres galato de metilo y protocatecuato de etilo se hidrolizaron menos eficazmente.

Además, se llevó a cabo un experimento similar en *L. plantarum* WCFS1, ya que los cultivos de esta cepa no presentan actividad feruloil esterasa. Para ello, se transformaron células de *L. plantarum* WCFS1 con el plásmido recombinante pNZ:TuR-1092. Una vez comprobado mediante PCR la presencia del gen *JDM1_1092* en los transformantes de *L. plantarum* WCFS1, se realizaron cultivos de esta cepa en presencia de *p*-cumarato de metilo, cafeato de metilo, ferulato de metilo y sinapinato de metilo durante una semana. Como control se utilizaron cultivos de la cepa *L. plantarum* WCFS1 transformada con el plásmido pNZ:TuR, incubada en las mismas condiciones.

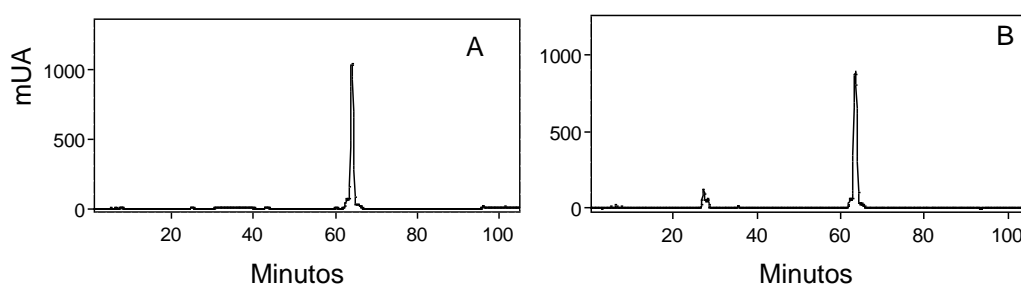


Figura 56. Cromatogramas de HPLC de los cultivos de *Lactobacillus plantarum* WCFS1 (pNZ) (1) y de *L. plantarum* WCFS1 (pNZTuR-1092) (2) en presencia de los ésteres aromáticos *p*-cumarato de metilo (A), cafeato de metilo (B), ferulato de metilo (C) y sinapinato de metilo (D) durante 7 días. Los cromatogramas se registraron a 280 nm. ApC, ácido *p*-cumárico; AC, ácido cafeico; AF, ácido ferúlico; AS, ácido sinápico.

Se pudo comprobar que de los cuatro ésteres de ácidos hidroxicinámicos estudiados, los cultivos de *L. plantarum* WCFS1 que presentaron la proteína JDM1_1092 sólo metabolizaron parcialmente dichos ésteres aromáticos. La Figura 56 muestra los cromatogramas de HPLC

obtenidos y se pueden observar los picos correspondientes a los ácidos *p*-cumárico, cafeico y ferúlico en los sobrenadantes obtenidos a partir de cultivos de *L. plantarum* WCFS1 pNZ:TuR-1092 y no se observaron como era de esperar en los cultivos de *L. plantarum* WCFS1 pNZ:TuR. A pesar de que la presencia de la proteína JDM1_1092 en *L. plantarum* WCFS1 confirió a esta cepa la capacidad de hidrolizar los ésteres de ácidos hidroxicinámicos, la hidrólisis no fue muy eficaz. Esto podría ser porque el promotor constitutivo TuR de *Lactobacillus reuteri* no funcione en *L. plantarum* tan bien como en *L. lactis*.

Como se ha comentado anteriormente, en *L. plantarum* se ha descrito que la enzima PAD que descarboxila los ácidos hidroxicinámicos (*p*-cumárico, cafeico y ferúlico) originando los vinil derivados correspondientes, los cuales posteriormente por acción de una reductasa se transforman en los productos etil derivados (Rodríguez, et al., 2008). La enzima PAD es muy eficaz en la descarboxilación de los ácidos hidroxicinámicos, por lo que el efecto de la actividad feruloil esterasa JDM1_1092 *in vivo* podría quedar enmascarado por una rápida transformación de los ácidos hidroxicinámicos producidos. Teniendo esto en cuenta, para estudiar mejor el efecto fisiológico de la feruloil esterasa JDM1_1092, se decidió transformar un mutante deficiente en el gen *pad* (Δ PAD), con el plásmido pNZ:TuR-1092. Para ello se pusieron cultivos de esta nueva construcción en presencia de los sustratos *p*-cumarato de metilo, cafeato de metilo y ferulato de metilo (1 mM), durante 7 días en el medio mínimo modificado RPM. En este caso, al no estar presente la enzima PAD, se identificaron los picos correspondientes a los ácidos *p*-cumárico, cafeico y ferúlico, aunque sólo en el caso del ferúlico se observó un pico de mayor intensidad correspondiente al ácido ferúlico con respecto a la cepa *L. plantarum* WCFS1 pNZ:TuR-1092. No obstante, cabe destacar, que estos ácidos pueden ser metabolizados por otras vías, aunque menos efectivas que la descarboxilación.

En esta tesis se han descrito por primera vez enzimas implicadas en el metabolismo de ésteres fenólicos como los derivados de los ácidos hidroxibenzoicos, pero además se ha descrito otra enzima de *L. plantarum* con actividad tanasa, que hidroliza ésteres de los ácidos gálico y protocatéquico.

Teniendo en cuenta que *L. plantarum* WCFS1 presenta actividad tanasa *in vivo*, para ver si la presencia de la proteína JDM1_1092 otorga a estos cultivos la capacidad de metabolizar los ésteres de ácidos benzoicos como el galato de metilo y 3,4-dihidroxibenzoato de etilo, se transformó el mutante de la cepa *L. plantarum* WCFS1 $\Delta TanB_{Lp}$, que presenta el gen *tanB_{Lp}* interrumpido, con el plásmido pNZ:TuR-1092. Anteriormente ya se había comprobado que la cepa WCFS1 con el gen *tanB_{Lp}* interrumpido es incapaz de hidrolizar dichos ésteres. Con el fin de estudiar la actividad tanasa *in vivo* de JDM1_1092 en el mutante defectivo, las cepas *L. plantarum* WCFS1 pNZ:TuR-1092 y *L. plantarum* WCFS1 $\Delta TanB_{Lp}$ (pNZ:TuR-1092) se cultivaron en presencia de galato de metilo y de 3,4-dihidroxibenzoato de etilo (1 mM), durante 7 días en un medio mínimo modificado. Como se observa en la Figura, el mutante *L. plantarum* WCFS1 $\Delta TanB_{Lp}$ no hidrolizó ninguno de los ésteres analizados, pero la presencia de la enzima JDM1_1092 tampoco produjo la hidrólisis de los mismos. Sin embargo, los cultivos de *L. lactis* transformados con el plásmido pNZ8048-1092 sí que presentaron actividad tanasa. La ausencia de actividad en *L. plantarum* WCFS1 $\Delta TanB_{Lp}$ (pNZ:TuR-1092) puede ser debido a que el gen JDM1_1092 se expresa peor en *L. plantarum* que en *L. lactis*.

3. Estudio de la expresión de genes de esterasas mediante RT-qPCR

Las bacterias lácticas producen esterasas, las cuales presentan una actividad variable para hidrolizar un amplio rango de sustratos artificiales (Sumby et al., 2012). Teniendo esto en cuenta, las bacterias lácticas podrían modificar el perfil de ésteres de los alimentos, en función de la actividad esterásica que presenten (Sumby et al., 2012). *L. plantarum* es la especie de bacteria láctica que se encuentra más frecuentemente en fermentaciones de

sustratos vegetales, donde los ésteres de ácidos fenólicos son abundantes. *L. plantarum*, presenta esterasas implicadas en el metabolismo de ésteres aromáticos, los cuales influyen significativamente en la calidad final de los alimentos dependiendo de la concentración en la que se encuentran.

Una vez demostrada la existencia de esterasas implicadas en el metabolismo de ésteres aromáticos en *L. plantarum* así como también de los efectos *in vivo*, el siguiente objetivo fue estudiar los niveles de expresión relativa de los genes que las codifican en presencia de dos sustratos relacionados con el metabolismo de ésteres de ácidos fenólicos. En el estudio se incluyeron los genes de todas las esterasas identificadas en *L. plantarum*, ya que aunque alguna esterasa no se ha podido caracterizar, si es interesante estudiar sus niveles de expresión en presencia de ésteres fenólicos. La cepa *L. plantarum* WCFS1 se incluyó como cepa modelo con una enzima feruloil esterasa y la cepa *L. plantarum* 1055 como cepa modelo con dos proteínas feruloil esterasas diferentes.

Para ello, se obtuvo RNA de cultivos de *L. plantarum* inducidos durante 10 min en presencia de ferulato de metilo y galato de metilo. El RNA extraído se incubó con la enzima DNAsa y posteriormente se sintetizó el cDNA, mediante la enzima retrotranscriptasa. Se amplificó una región interna de los genes *lp_0796*, *lp_0973*, *lp_1002*, *lp_1328*, *lp_1578*, *lp_1760*, *lp_2631*, *lp_2660*, *lp_2923*, *lp_2953*, *lp_3505*, *lp_3561*, *lp_3562* y *JDM1_1092*, mediante los oligonucleótidos 977-978, 979-980, 981-982, 983-984, 985-986, 987-988, 989-990, 991-992, 993-994 1025-1026, 1027-1028, 1029-1030 y 1031-1032 respectivamente (ver Materiales y Métodos). Una vez validados los oligonucleótidos, se estudió la expresión relativa de los genes mediante RT-qPCR y se analizaron los cambios en la expresión relativa de los genes respecto al nivel de transcripción de los mismos utilizando el cDNA obtenido a partir de cultivos de *L. plantarum* sin inducir (Figura 57). Inicialmente se realizó un estudio de validación con varios genes endógenos (*ldh*, 16S y *dnaG*) mediante el programa <http://leonxie.com/referencegene.php?type=reference> y se decidió utilizar como control endógeno el gen 16S por ser el que mejores

resultados presentó.

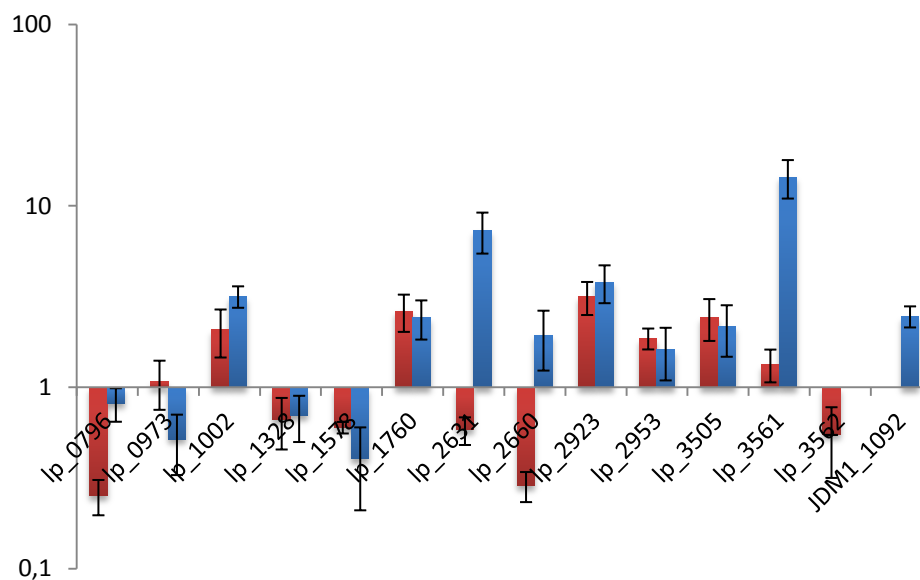


Figura 57. Análisis de la expresión génica mediante RT-qPCR de *L. plantarum* 1055 (azul) y *L. plantarum* WCFS1(rojo) en presencia de 30 mM de ferulato de metilo.

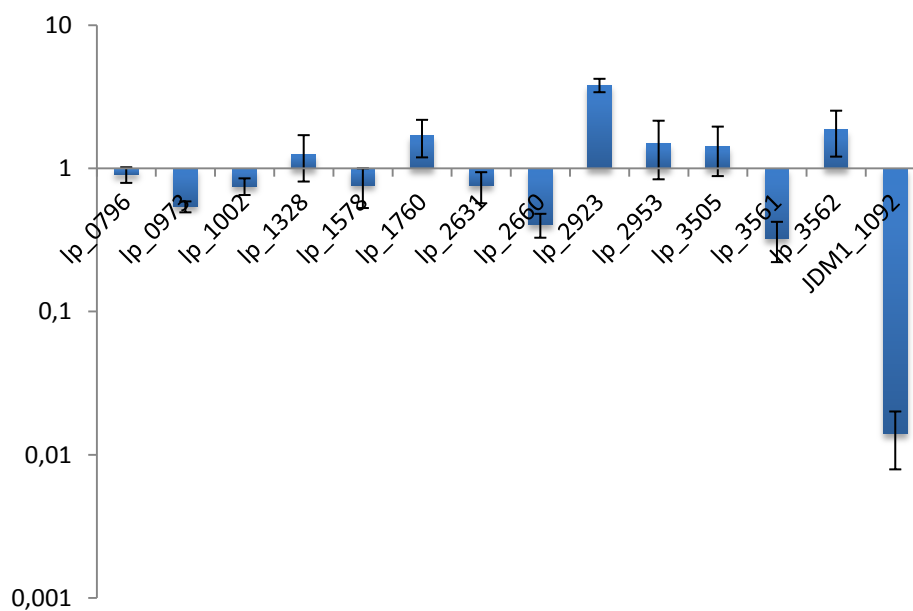


Figura 57. Análisis de la expresión génica mediante RT-qPCR de *L. plantarum* 1055 en presencia de 30 mM de galato de metilo.

Los niveles de expresión obtenidos fueron sustancialmente diferentes entre las dos cepas así como también entre los diferentes genes. Se observa que en los cultivos de *L. plantarum* 1055 (que presenta los dos genes de feruloil esterases) incubados en presencia de ferulato de metilo, los genes *lp_1002*, *lp_2631*, *lp_2923*, *lp_3561* y *JDM1_1092* presentaron un nivel de expresión diferencial superior respecto al mismo gen en condiciones normales (sin inducir) de aproximadamente 3, 7, 4, 14 y 2.5 veces respectivamente. Curiosamente, estos genes codifican proteínas implicadas en el metabolismo de ésteres aromáticos, ya que *Lp_1002*, *Lp_2631*, *Lp_2923*, *Lp_3561* son arilesterasas y la proteína *JDM1_1092* es una feruloil esterasa con actividad tanasa. Estos resultados sugieren que estos genes de esterases juegan un papel en el metabolismo de ésteres aromáticos. Sin embargo, los niveles de expresión del gen *lp_0796* en presencia de ferulato de metilo no presentó una expresión diferencial significativa con respecto al mismo gen sin inducir, lo que indica que no se induce la expresión del gen *lp_0796* que codifica una feruloil esterasa en presencia de su sustrato en las condiciones descritas. El gen *lp_0796* se comportó igual en la cepa *L. plantarum* WCFS1, por lo tanto este gen no es inducible con su sustrato en estas condiciones. Los únicos genes de *L. plantarum* WCFS1 presentaron una expresión diferencial fueron *lp_1760* y *lp_2923*, que presentaron unos niveles de expresión similares a los presentados en la cepa *L. plantarum* 1055. Para ver el comportamiento de estos genes en presencia de un éster aromático diferente como el galato de metilo (sustrato de tanasas), se estudiaron los niveles de expresión en las dos cepas. Curiosamente, en la cepa *L. plantarum* 1055 el gen *JDM1_1092* se encuentra reprimido en presencia de galato de metilo, por lo que presentó un comportamiento opuesto que en presencia de ferulato de metilo, siendo ambos sus sustratos. El nivel de expresión del gen *TanA_{Lp}* que codifica una tanasa presente sólo en algunas cepas de *L. plantarum* tampoco varió en presencia de su sustrato galato de metilo (Jiménez et al., 2014). El único gen que presentó un aumento en los niveles de expresión fue el gen *lp_2923*, por lo que este gen parece que se induce en presencia de distintos ésteres fenólicos, ya que se observó un resultado similar en *L. plantarum* WCFS1 en presencia de galato de metilo. Estos resultados indican que *L. plantarum* presenta genes implicados en

el metabolismo de ésteres aromáticos como ésteres de ácidos hidroxibenzoico y ésteres de ácidos benzoicos. Las esterasas presentan una actividad dual, ya que llevan a cabo la síntesis o la hidrólisis de ésteres dependiendo de las condiciones de reacción. Los genes que en presencia de los ésteres no han variado sus niveles de expresión, como el gen que codifica la feruloil esterasa Lp_0796 podría ser porque estarían implicados en la síntesis de ésteres, por lo que igual en presencia de los ácidos fenólicos podrían haber presentado un comportamiento diferente. Además, se ha descrito que la esterificación es un mecanismo de detoxificación, ya que los ácidos fenólicos producen un mayor daño celular que los ésteres derivados. Hasta la fecha no hay muchos trabajos descritos sobre el estudio de la expresión de esterasas de bacterias lácticas en la bibliografía. Sumbly y colaboradores en el año 2012 estudiaron la expresión de 4 genes de esterasas en *O. oeni*, los cuales respondieron de forma diferencial en presencia de ésteres como el butirato de etilo o en presencia del ácido butírico (Sumbly et al., 2012). Con respecto al estudio de ésteres aromáticos, se ha descrito que la tanasa *TanB_{Lp}* de *L. plantarum* aumenta su expresión 3 veces en presencia de galato de metilo, aunque experimenta un aumento más significativo en presencia de los ácidos gálico y tánico. Se han descrito estudios de expresión relativa de genes de feruloil esterasas en el hongo *Fusarium graminearum*, los cuales se inducen en presencia de un pequeño grupo de compuestos aromáticos como ácido ferúlico, ácido cafeico y ácido *p*-cumárico.

CONCLUSIONES

Conclusions

1. We have described for the first time the presence of feruloyl esterase activity in *Lactobacillus plantarum* cultures. This activity favours the thriving of this microorganism on plant-derived substrates.
2. The enzymes from *L. plantarum* (Lp_0973, Lp_1002, Lp_2923, Lp_2631, Lp_3505, Lp_3561, Lp_0796 y Est_1092) exhibit arylesterase and/or feruloyl esterase activities and are able to hydrolyse phenolic esters compounds.
3. The crystal structures of arylesterases Lp_0973 y Lp_2923 have provided relevant information for the development of novel variants with improved biochemical properties, with potential industrial applications.
4. For the first time, novel esterases acting against hydroxycinnamic esters or feruloyl esterases (Lp_0796 y Est_1092) have been genetically identified and biochemically characterized in *L. plantarum*. These enzymes are currently interesting from a biotechnological viewpoint.
5. Despite all *L. plantarum* strains tested possess the feruloyl esterase Lp_0796, they do not metabolise esters of hydroxycinnamic acids when cultured. Only cultures from the above strains possessing also the feruloyl esterase Est_1092 exhibited this esterase activity. The presence of a protein transporter, whose gene is contiguous to the *est_1092* gene underlies this phenotype.
6. The induction of the expression of the feruloyl esterase gene *est_1092* in *L. plantarum* has been demonstrated, when this microorganism grows on plant-derived substrates containing esters of hydroxycinnamic acids. This makes it possible the use of these compounds, therefore favouring the adaptation of *L. plantarum* to this environment.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Akoh CC, Lee GC, Liaw YC, Huang TH, & Shaw JF** (2004) GDSL family of serine esterases/lipases. *Progress in lipid research* 43:534-552.
2. **Andersen HJ, Østdal H, & Blom H** (1995) Partial purification and characterization of an esterase-lipase from *Lactobacillus plantarum* MF 32. *Food Chemistry* 53:369-373.
3. **Arpigny JL & Jaeger KE** (1999) Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *The Biochemical journal* 343 Pt 1:177-183.
4. **Arrecubieta C, Garcia E, & Lopez R** (1995) Sequence and transcriptional analysis of a DNA region involved in the production of capsular polysaccharide in *Streptococcus pneumoniae* type 3. *Gene* 167:1-7.
5. **Aukrust T & Blom H** (1992) Transformation of *Lactobacillus* strains used in meat and vegetable fermentations. *Food Research International* 25:253-261.
6. **Axelsson L, et al.** (2012) Genome sequence of the naturally plasmid-free *Lactobacillus plantarum* strain NC8 (CCUG 61730). *Journal of bacteriology* 194:2391-2392.
7. **Bel-Rhlid R, et al.** (2009) Hydrolysis of rosmarinic acid from rosemary extract with esterases and *Lactobacillus johnsonii* in vitro and in a gastrointestinal model. *Journal of agricultural and food chemistry* 57:7700-7705.
8. **Bel-Rhlid R, et al.** (2012) Hydrolysis of chicoric and caftaric acids with esterases and *Lactobacillus johnsonii* in Vitro and in a gastrointestinal model. *Journal of agricultural and food chemistry* 60:9236-9241.
9. **Benoit I, Danchin EG, Bleichrodt RJ, & de Vries RP** (2008) Biotechnological applications and potential of fungal feruloyl esterases based on prevalence, classification and biochemical diversity. *Biotechnology letters* 30:387-396.
10. **Bornscheuer UT** (2002) Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS microbiology reviews* 26:73-81.
11. **Brod FC, Vernal J, Bertoldo JB, Terenzi H, & Arisi AC** (2010) Cloning, expression, purification, and characterization of a novel esterase from *Lactobacillus plantarum*. *Molecular biotechnology* 44:242-249.
12. **Buron N, et al.** (2011) Screening of representative cider yeasts and bacteria for volatile phenol-production ability. *Food microbiology* 28:1243-1251.
13. **Caplice E & Fitzgerald GF** (1999) Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International journal of food microbiology* 50:131-149.
14. **Couteau D, McCartney AL, Gibson GR, Williamson G, & Faulds CB** (2001) Isolation and characterization of human colonic bacteria able to hydrolyse chlorogenic acid. *Journal of applied microbiology* 90:873-881.
15. **Curiel JA, de Las Rivas B, Mancheno JM, & Munoz R** (2011) The pURI family of expression vectors: a versatile set of ligation independent cloning plasmids for producing recombinant His-fusion proteins. *Protein expression and purification* 76:44-53.
16. **Curiel JA, et al.** (2009) Production and physicochemical properties of recombinant *Lactobacillus plantarum* tannase. *Journal of agricultural and food chemistry* 57:6224-6230.

17. **Cheeseman JD, Tocilj A, Park S, Schrag JD, & Kazlauskas RJ** (2004) Structure of an aryl esterase from *Pseudomonas fluorescens*. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* 60:1237-1243.
18. **Choi YJ, Miguez CB, & Lee BH** (2004) Characterization and heterologous gene expression of a novel esterase from *Lactobacillus casei* CL96. *Applied and environmental microbiology* 70:3213-3221.
19. **de las Rivas B, Curiel JA, Mancheno JM, & Munoz R** (2007) Expression vectors for enzyme restriction- and ligation-independent cloning for producing recombinant His-fusion proteins. *Biotechnology progress* 23:680-686.
20. **Ditty JL & Harwood CS** (2002) Charged amino acids conserved in the aromatic acid/H⁺ symporter family of permeases are required for 4-hydroxybenzoate transport by PcaK from *Pseudomonas putida*. *Journal of bacteriology* 184:1444-1448.
21. **Faulds CB** (2010) What can feruloyl esterase do for us? . *Phytochemistry Reviews* 9:121-132.
22. **Faulds CB** (2010) What can feruloyl esterases do for us? *Phytochemistry Reviews* 9:121-132.
23. **Fenster KM, Parkin KL, & Steele JL** (2000) Characterization of an arylesterase from *Lactobacillus helveticus* CNRZ32. *Journal of applied microbiology* 88:572-583.
24. **Fenster KM, Parkin KL, & Steele JL** (2003) Nucleotide sequencing, purification, and biochemical properties of an arylesterase from *Lactobacillus casei* LILA. *Journal of dairy science* 86:2547-2557.
25. **Fojan P, Jonson PH, Petersen MT, & Petersen SB** (2000) What distinguishes an esterase from a lipase: a novel structural approach. *Biochimie* 82:1033-1041.
26. **Garrido J & Borges F** (2013) Wine and grape polyphenols- A chemical perspective. *Food Research International* 54:1844-1858.
27. **Gobbetti M & Fox PF** (1996) Purification and characterization of a dipeptidase from *Pseudomonas fluorescens* ATCC 948. *Journal of dairy science* 79:357-365.
28. **GOBBETTI M, Fox PF, Smacchi E, Stepaniak L, & DAMIANI P** (1996) PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF A LIPASE FROM LACTOBACILLUS PLANTARUM 2739
Journal of Food Biochemistry 20:227-246.
29. **Gobbetti M, Fox PF, & Stepaniak L** (1997) Isolation and characterization of a tributyrin esterase from *Lactobacillus plantarum* 2739. *Journal of dairy science* 80:3099-3106.
30. **Guglielmetti S, et al.** (2008) Bacterial cinnamoyl esterase activity screening for the production of a novel functional food product. *Applied and environmental microbiology* 74:1284-1288.
31. **Gupta MN & Roy I** (2004) Enzymes in organic media. Forms, functions and applications. *European journal of biochemistry / FEBS* 271:2575-2583.
32. **Hanahan D** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of molecular biology* 166:557-580.

33. **Harborne JB & Williams CA** (2000) Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55:481-504.
34. **Hugenholtz J** (2008) The lactic acid bacterium as a cell factory for food ingredient production. *International Dairy Journal* 18:466-475.
35. **Jaeger KE, Dijkstra BW, & Reetz MT** (1999) Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annual review of microbiology* 53:315-351.
36. **Jancarik J & Kim S-H** (1991) Sparse matrix sampling. A screening method for crystallization of proteins. *Journal of applied Crystallography* 24:409-411.
37. **Jimenez N, Barcenilla JM, de Felipe FL, de Las Rivas B, & Munoz R** (2014) Characterization of a bacterial tannase from *Streptococcus gallolyticus* UCN34 suitable for tannin biodegradation. *Applied microbiology and biotechnology*.
38. **Jimenez N, Curiel JA, Reveron I, de Las Rivas B, & Munoz R** (2013) Uncovering the *Lactobacillus plantarum* WCFS1 gallate decarboxylase involved in tannin degradation. *Applied and environmental microbiology* 79:4253-4263.
39. **Jimenez N, Esteban-Torres M, Mancheno JM, de Las Rivas B, & Munoz R** (2014) Tannin Degradation by a Novel Tannase Enzyme Present in Some *Lactobacillus plantarum* Strains. *Applied and environmental microbiology* 80:2991-2997.
40. **Johansson ML, et al.** (1993) Administration of different *Lactobacillus* strains in fermented oatmeal soup: in vivo colonization of human intestinal mucosa and effect on the indigenous flora. *Applied and environmental microbiology* 59:15-20.
41. **Jones RM, Collier LS, Neidle EL, & Williams PA** (1999) areABC genes determine the catabolism of aryl esters in *Acinetobacter* sp. Strain ADP1. *Journal of bacteriology* 181:4568-4575.
42. **Kim KK, Song HK, Shin DH, Hwang KY, & Suh SW** (1997) The crystal structure of a triacylglycerol lipase from *Pseudomonas cepacia* reveals a highly open conformation in the absence of a bound inhibitor. *Structure* 5:173-185.
43. **Kleerebezem M, et al.** (2003) Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:1990-1995.
44. **Knockaert D, Raes K, Wille C, Struijs K, & Van Camp J** (2012) Metabolism of ferulic acid during growth of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus collinoides*. *Journal of the science of food and agriculture* 92:2291-2296.
45. **Kolling DJ, Suguino WA, Brod FC, & Arisi AC** (2011) Immobilization of a recombinant esterase from *Lactobacillus plantarum* on polypropylene Accurel MP1000. *Applied biochemistry and biotechnology* 163:304-312.
46. **Lafay S & Gil-Izquierdo A** (2008) Bioavailability of phenolic acids. *Phytochemistry Reviews* 7:301-311.
47. **Lai KK, Lorca GL, & Gonzalez CF** (2009) Biochemical properties of two cinnamoyl esterases purified from a *Lactobacillus johnsonii* strain isolated from stool samples of diabetes-resistant rats. *Applied and environmental microbiology* 75:5018-5024.

48. **Laue TM, Shah BD, Ridgeway TM, & Pelletier SL** (1992) Computer aided interpretation of analytical sedimentation data for proteins. *Analytical Ultracentrifugation in Biochemistry and Polymer Science Society of Chemistry*:96-125.
49. **Lekha PK & Lonsane BK** (1997) Production and application of tannin acyl hydrolase: state of the art. *Advances in applied microbiology* 44:215-260.
50. **Li X, et al.** (2013) Complete genome sequence of the probiotic *Lactobacillus plantarum* strain ZJ316. *Genome announcements* 1:e0009413.
51. **Liu SQ, et al.** (2010) Characterisation of esterases of *Streptococcus thermophilus* ST1 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* B1079 as alcohol acyltransferases. *International Dairy Journal* 14:865–870.
52. **Lopes Mde F, Cunha AE, Clemente JJ, Carrondo MJ, & Crespo MT** (1999) Influence of environmental factors on lipase production by *Lactobacillus plantarum*. *Applied microbiology and biotechnology* 51:249-254.
53. **Lopes Mde F, et al.** (2002) Characterization of a highly thermostable extracellular lipase from *Lactobacillus plantarum*. *International journal of food microbiology* 76:107-115.
54. **Lynd LR, Weimer PJ, van Zyl WH, & Pretorius IS** (2002) Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR 66:506-577, table of contents.
55. **Madej MG, Dang S, Yan N, & Kaback HR** (2013) Evolutionary mix-and-match with MFS transporters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110:5870-5874.
56. **Makarova K, et al.** (2006) Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:15611-15616.
57. **Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, & Jimenez L** (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition* 79:727-747.
58. **Matthews A, et al.** (2004) Lactic acid bacteria as a potential source of enzymes for use in vinification. *Applied and environmental microbiology* 70:5715-5731.
59. **Muscariello L, Marasco R, De Felice M, & Sacco M** (2001) The functional *ccpA* gene is required for carbon catabolite repression in *Lactobacillus plantarum*. *Applied and environmental microbiology* 67:2903-2907.
60. **Navarro-Gonzalez I, Sanchez-Ferrer A, & Garcia-Carmona F** (2012) Molecular characterization of a novel arylesterase from the wine-associated acetic acid bacterium *Gluconobacter oxidans* 621H. *Journal of agricultural and food chemistry* 60:10789-10795.
61. **Nogales J, et al.** (2011) Unravelling the gallic acid degradation pathway in bacteria: the gal cluster from *Pseudomonas putida*. *Molecular microbiology* 79:359-374.
62. **Oterholm A, Ordal ZJ, & Witter LD** (1968) Glycerol ester hydrolase activity of lactic acid bacteria. *Applied microbiology* 16:524-527.
63. **Panda T & Gowrishankar BS** (2005) Production and applications of esterases. *Applied microbiology and biotechnology* 67:160-169.

64. **Park YJ, Yoon SJ, & Lee HB** (2008) A novel thermostable arylesterase from the archaeon *Sulfolobus solfataricus* P1: purification, characterization, and expression. *Journal of bacteriology* 190:8086-8095.
65. **Perpetuini G, et al.** (2013) Identification of critical genes for growth in olive brine by transposon mutagenesis of *Lactobacillus pentosus* C11. *Applied and environmental microbiology* 79:4568-4575.
66. **Robbins RJ** (2003) Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *Journal of agricultural and food chemistry* 51:2866-2887.
67. **Rodriguez H, et al.** (2009) Food phenolics and lactic acid bacteria. *International journal of food microbiology* 132:79-90.
68. **Rodriguez H, et al.** (2008) Characterization of the p-coumaric acid decarboxylase from *Lactobacillus plantarum* CECT 748(T). *Journal of agricultural and food chemistry* 56:3068-3072.
69. **Rozes N & Pères C** (1998) Effects of phenolic compounds on the growth and the fatty acid composition of *Lactobacillus plantarum*. *Applied microbiology and biotechnology* 49:108-111.
70. **Sakai Y, Ayukawa K, Yurimoto H, Yamamoto K, & Kato N** (1998) A novel arylesterase active toward 7-aminocephalosporanic acid from *Agrobacterium radiobacter* IFO 12607: Purification and characterization. *J. Ferment. Bioeng* 85:58-62.
71. **Sambrook J, Fritsch EF, & Manniatis T** (1989) Molecular cloning. A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY* 2nd Eds.
72. **Sanchez-Maldonado AF, Schieber A, & Ganzle MG** (2011) Structure-function relationships of the antibacterial activity of phenolic acids and their metabolism by lactic acid bacteria. *Journal of applied microbiology* 111:1176-1184.
73. **Schuck P** (2000) Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and lamm equation modeling. *Biophysical journal* 78:1606-1619.
74. **Serrano J, Puupponen-Pimia R, Dauer A, Aura AM, & Saura-Calixto F** (2009) Tannins: current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. *Molecular nutrition & food research* 53 Suppl 2:S310-329.
75. **Sharma R, Chisti Y, & Banerjee UC** (2001) Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology advances* 19:627-662.
76. **Shaw JF, et al.** (1994) Nucleotide sequence of a novel arylesterase gene from *Vibrio mimicus* and characterization of the enzyme expressed in *Escherichia coli*. *The Biochemical journal* 298 Pt 3:675-680.
77. **Siezen RJ & van Hylckama Vlieg JE** (2011) Genomic diversity and versatility of *Lactobacillus plantarum*, a natural metabolic engineer. *Microbial cell factories* 10 Suppl 1:S3.
78. **Silva Lopes Mde F, Leitao AL, Marques JJ, Carrondo MJ, & Crespo MT** (1999) Processing of extracellular lipase of *Lactobacillus plantarum*: involvement of a metalloprotease. *FEMS microbiology letters* 176:483-487.
79. **Smid EJ & Lacroix C** (2013) Microbe-microbe interactions in mixed culture food fermentations. *Current opinion in biotechnology* 24:148-154.

80. **Stiles ME & Holzapfel WH** (1997) Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International journal of food microbiology* 36:1-29.
81. **Sumby KM, Matthews AH, Grbin PR, & Jiranek V** (2009) Cloning and characterization of an intracellular esterase from the wine-associated lactic acid bacterium *Oenococcus oeni*. *Applied and environmental microbiology* 75:6729-6735.
82. **Tohge T, Watanabe M, Hoefgen R, & Fernie AR** (2013) Shikimate and phenylalanine biosynthesis in the green lineage. *Frontiers in plant science* 4:62.
83. **Tomás-Barberán FA & Espín JC** (2001) Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81:853-876.
84. **Vagin A & Teplyakov A** (1997) MOLREP: An Automated Program for Molecular Replacement. *Journal of applied Crystallography* 30:1022-1025.
85. **Vanbeneden N, Saison D, Delvaux F, & Delvaux FR** (2008) Decrease of 4-vinylguaiacol during beer aging and formation of apocynol and vanillin in beer. *Journal of agricultural and food chemistry* 56:11983-11988.
86. **Vieites JM, et al.** (2010) Inter-conversion of catalytic abilities in a bifunctional carboxyl/feruloyl-esterase from earthworm gut metagenome. *Microbial biotechnology* 3:48-58.
87. **Wang X, Geng X, Egashira Y, & Sanada H** (2004) Purification and characterization of a feruloyl esterase from the intestinal bacterium *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and environmental microbiology* 70:2367-2372.
88. **Wang Y, et al.** (2011) Complete genome sequence of the probiotic *Lactobacillus plantarum* ST-III. *Journal of bacteriology* 193:313-314.
89. **Winkler FK, D'Arcy A, & Hunziker W** (1990) Structure of human pancreatic lipase. *Nature* 343:771-774.
90. **Winn MD, et al.** (2011) Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* 67:235-242.
91. **Yao J, Fan XJ, Lu Y, & Liu YH** (2011) Isolation and characterization of a novel tannase from a metagenomic library. *Journal of agricultural and food chemistry* 59:3812-3818.
92. **Zhang ZY, et al.** (2009) Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* JDM1. *Journal of bacteriology* 191:5020-5021.